

Université de Montréal

Étude des effets de la tétrahydrobioptérine sur la dysfonction endothéliale des artères
coronaires induite par circulation extracorporelle dans un modèle porcin

Par

Louis-Mathieu Stevens, MD

Département de Chirurgie
Institut de Cardiologie de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences biomédicales

Décembre 2004

© Louis-Mathieu Stevens 2004



w)

4

U58

2005

v. 118

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des effets de la tétrahydrobioptérine sur la dysfonction endothéliale des artères
coronaires induite par circulation extracorporelle dans un modèle porcin

Présenté par

Louis-Mathieu Stevens, MD

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Philippe Demers, MD

Président-rapporteur

Louis P. Perrault, MD, PhD

Directeur de recherche

André Denault, MD

Membre du jury

RÉSUMÉ ANGLAIS

Cardiopulmonary bypass (CPB) contributes to the systemic inflammatory response syndrome following heart surgery. The endothelial function of epicardial coronary arteries is impaired following exposure to CPB and is associated with a decrease in cyclic guanosine monophosphate release and increased oxydative stress. Tetrahydrobiopterin (BH₄) is a potent antioxydant and an essential cofactor of nitric oxyde biosynthesis. We hypothesize that CPB induce a state of depletion and decreased activity of the endogenous BH₄ responsible for the NO synthase uncoupling and the coronary arteries endothelial dysfunction. The objective of this project was to assess if the *in vitro* administration of BH₄ improves the endothelium-dependent relaxation of coronary arteries in a swine model of CPB.

Swine underwent 90 min of CPB followed by a 60 min period of reperfusion following weaning from CPB. After contraction with prostaglandin F_{2α}, endothelium-dependent relaxations of epicardial coronary artery rings to serotonin – which binds to 5HT_{1D} receptors coupled to Gi-proteins – and bradykinin (B₂ receptors coupled to Gq-proteins) were studied in the presence or absence of BH₄ using standard organ chamber experiments.

CPB caused a statistically significant reduction of endothelium-dependent relaxations to serotonin and bradykinin in coronary arteries. BH₄ supplementation following CPB improved the endothelium-dependent relaxations to serotonin and bradykinin. Endothelium-independent relaxations to sodium nitroprussiate were unaltered. BH₄ could play an important role in preventing and treating the systemic endothelial dysfunction resulting from CPB.

Keywords: Antioxydants; Cardiopulmonary bypass; Coronary artery; Endothelial dysfunction; Nitric oxyde; Surgery; Tetrahydrobiopterin.

RÉSUMÉ FRANÇAIS

La circulation extracorporelle (CEC) est impliquée dans le syndrome de réponse inflammatoire systémique suivant la chirurgie cardiaque. La fonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques est altérée suite à la CEC et associée à une diminution de la relâche de guanosine monophosphate cyclique et une augmentation du stress oxydatif. La tétrahydrobioptérine (BH₄) est un puissant antioxydant et un cofacteur essentiel dans la biosynthèse du monoxyde d'azote (NO). Nous avons émis comme hypothèse que la CEC induit un état de déplétion et de diminution d'activité de la BH₄ endogène responsable du défaut de couplage de la synthase du NO et de la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques. L'objectif de ce projet était de vérifier si l'administration *in vitro* de BH₄ améliore la relaxation endothélium-dépendante des artères coronaires post-CEC chez le porc.

Des porcs furent soumis à une CEC de 90 minutes suivi d'une période de 60 minutes après le sevrage de la CEC. Après contraction avec la prostaglandine F_{2α}, les relaxations endothélium-dépendantes des artères coronaires épicaudiques à la sérotonine – laquelle lie les récepteurs 5HT_{1D} couplés aux protéines-Gi – et la bradykinine (récepteurs B₂ couplés aux protéines-Gq) furent étudiées en présence ou absence de BH₄ en chambre d'organe.

La CEC cause une baisse statistiquement significative des relaxations endothélium-dépendantes à la sérotonine et à la bradykinine chez les artères coronaires épicaudiques porcines. Suite à la CEC, l'ajout de BH₄ a permis d'améliorer les relaxations endothélium-dépendantes à la sérotonine et à la bradykinine. Les relaxations endothélium-indépendantes au nitroprusside de sodium étaient similaires. Le BH₄ pourrait jouer un rôle important dans la prévention et le traitement de la dysfonction endothéliale systémique résultant de la CEC.

Mots-clés : Antioxydants; Artères coronaires; Chirurgie; Circulation extracorporelle; Dysfonction endothéliale; Monoxyde d'azote; Tétrahydrobioptérine.

TABLE DES MATIÈRES

Page titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé anglais.....	iii
Résumé français	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xix
Chapitre I : Introduction.....	1
L'endothélium	2
Physiologie endothéliale normale	4
L'endothélium dysfonctionnel	18
Principes de base de la circulation extracorporelle	21
Atteinte organique multisystémique et circulation extracorporelle	22
Effets de la tétrahydrobioptérine	42

Dysfonction endothéliale des artères coronaires suivant la circulation extracorporelle.....	47
Chapitre II : Hypothèses et buts	49
Chapitre III: Corps de la thèse – Article original	52
<i>Effect of tetrahydrobiopterin for coronary endothelial dysfunction induced by cardiopulmonary bypass</i>	53
Chapitre IV : Discussion des résultats	81
Chapitre V : Conclusion et perspectives	85
Chapitre VI : Sources documentaires.....	88

LISTE DES TABLEAUX

Article: *Effect of tetrahydrobiopterin for coronary endothelial dysfunction induced by cardiopulmonary bypass*

Table I Contraction to potassium chloride (KCl) and prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ of porcine coronary arteries after cardiopulmonary bypass (CPB). Contractile responses to a depolarizing physiological solution containing 60 mM KCl and concentration of $PGF_{2\alpha}$ required to achieve 50% of KCl-induced contraction of pulmonary arteries isolated from control pigs (n=6) and pigs that underwent CPB (n=6) with or without administration of tetrahydrobiopterin (BH_4). Data expressed as mean \pm SD. * For achieving 50% of KCl contraction. $^{\S} p = 0.03$ control vs CPB and CPB+ BH_4 . $^{\P} p < 0.001$ control vs CPB and CPB+ BH_4 .

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

- Figure 1 Processus de transduction et fonctions de l'endothélium normal. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)
- Figure 2 Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)
- Figure 3 Médiateurs neurohumoraux menant à la sécrétion de facteurs vasorelaxants (EDRF). (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)
- Figure 4 Mécanisme menant à la relaxation du muscle vasculaire lisse. (Tiré de : Boulanger C, Vanhoutte PM. The endothelium: a pivotal role in health and cardiovascular disease. Servier, 1994.)
- Figure 5 Facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCF). (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)
- Figure 6 Endothélium dysfonctionnel. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)
- Figure 7 Circuit de circulation extracorporelle. (Schéma réalisé par Louis-Mathieu Stevens, MD)

- Figure 8 Interactions des protéines plasmatiques avec les biomatériaux. (Tiré de : Edmunds LH. Cardiopulmonary bypass after 50 years. *N Engl J Med* 2004;351:1603-1606.)
- Figure 9 Mécanismes impliqués dans la réponse inflammatoire systémique secondaire à la circulation extracorporelle. (Schéma réalisé par Louis-Mathieu Stevens, MD)
- Figure 10 Voies de coagulation et de fibrinolyse. (Tiré de : Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;342:1792-1801.)
- Figure 11 Système du complément : voies classique et alterne. (Tiré de : Asimakopoulos G, Smith PLC, Ratnatunga CP, Taylor KM. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1107-15.)
- Figure 12 Interaction entre les produits plaquettaires, la thrombine et l'endothélium. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux* 1997; 90:9-19.)
- Figure 13 Interactions entre les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes. (Tiré de : Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation : pathophysiology and treatment – An update. *Eur J Cardiothor Surg* 2002;21:232-244.)
- Figure 14 Ischémie-reperfusion et formation de radicaux libres de l'oxygène au lieu du monoxyde d'azote et état de déplétion de tétrahydrobioptérine. (Tiré de : Seccombe JF, Schaff HV. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995;60:778-788.)

- Figure 15 Régulation de l'activité de la synthase endothéliale du monoxyde d'azote par la tétrahydrobioptérine dans la maladie vasculaire. (Tiré de : Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1-9.)
- Figure 16 Défaut de couplage de la synthase endothéliale du monoxyde d'azote causé par une déplétion de la tétrahydrobioptérine et une augmentation du stress oxydatif suite à la circulation extracorporelle et ses effets sur la vasomotricité. (Schéma réalisé par Louis-Mathieu Stevens, MD).
- Figure 17 Mécanismes proposés de l'amélioration de la dysfonction endothéliale secondaire à la circulation extracorporelle par la tétrahydrobioptérine. (Schéma réalisé par Louis-Mathieu Stevens, MD).

Article: *Effect of tetrahydrobiopterin for coronary endothelial dysfunction induced by cardiopulmonary bypass*

- Figure 1 Cumulative concentration-response curve to the endothelium-dependent vasodilator serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF_{2α} (% E_{max}). Results are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.05$ CPB vs CPB + BH₄. CPB: cardiopulmonary bypass; BH₄: tetrahydrobiopterin.
- Figure 2 Cumulative concentration-response curve to the endothelium-dependent vasodilator bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries. Responses are given as a percentage of maximal contraction to serotonin (5HT). Results are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$ vs control. CPB: cardiopulmonary bypass; BH₄: tetrahydrobiopterin.
- Figure 3 eNOS uncoupling caused by endogenous tetrahydrobiopterin (BH₄) depletion and increased oxydative stress following cardiopulmonary bypass and their effect on vasomotor tone.

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

5HT:	5-hydroxytryptamine créatinine sulfate ou sérotonine (<i>serotonin</i>)
5HT _{1D} :	Récepteurs sérotoninergiques 1D (<i>serotonergic receptor 1D</i>)
AA :	Acide arachidonique
ACh :	Acétylcholine
ACT:	Temps de céphaline activée (<i>activated coagulation time</i>)
ADP :	Adénosine diphosphate
AMPc (<i>cAMP</i>) :	3'-5'adénosine monophosphate cyclique (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
ANOVA :	Analyse de variance (<i>analysis of variance</i>)
ARDS :	Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine triphosphate
AVP :	Arginine vasopressine
B ₂ :	Récepteur B ₂ à la bradykinine
BH ₄ :	5,6,7,8-tétrahydroptérine (<i>tetrahydrobiopterin</i>)
BK:	Bradykinine (<i>bradykinin</i>)
BSA:	Surface corporelle (<i>body surface area</i>)

CaCl ₂ :	Chlorure de calcium (<i>calcium chloride</i>)
CD4+ :	Lymphocyte assistant/inducteur
CD8+ :	Lymphocyte cytotoxique/suppresseur
CEC:	Circulation extracorporelle
CHF:	Insuffisance cardiaque (<i>congestive heart failure</i>)
CI:	Débit cardiaque indexé (<i>cardiac index</i>)
CO:	Débit cardiaque (<i>cardiac output</i>)
CPB:	Circulation extracorporelle (<i>cardiopulmonary bypass</i>)
CVP:	Pression veineuse centrale (<i>central venous pressure</i>)
DAHP :	2,4,-diamino-6-hydroxypyrimidine
DO ₂ :	Transport en oxygène (<i>oxygen delivery</i>)
E :	Épinéphrine
ECG/EKG:	Électrocardiogramme (<i>electrocardiogram</i>)
EDCF :	Facteurs contractants dérivés de l'endothélium (<i>endothelium derived contracting factors</i>)
EDHF :	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (<i>endothelium derived hyperpolarizing factor</i>)
EDRF :	Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (<i>endothelium derived relaxing factors</i>)
ET-1, -2, -3 :	Endothéline-1, -2, -3

ET _A et ET _B :	Récepteurs à l'endothéline ET _A et ET _B
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FiO ₂ :	Fraction inspirée en oxygène (<i>inspired oxygen fraction</i>)
FMN :	Flavine mononucléotide
FR:	Français (<i>french</i>)
G :	Protéines-G
g:	Gramme
G _{Ib} , G _{IIb} /IIIa :	Récepteurs glycoprotéiques plaquettaires G _{Ib} et G _{IIb} /IIIa
GMPc (<i>cGMP</i>) :	3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
H :	Récepteur de l'histamine H
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène (<i>hydrogen peroxyde</i>)
Hb:	Hémoglobine (<i>haemoglobin</i>)
HMWK :	Kininogène de haut poids moléculaire (<i>high molecular weight kininogen</i>)
HR:	Fréquence cardiaque (<i>heart rate</i>)
ICAM-1 :	Molécule d'adhésion intercellulaire
IL :	Interleukine
IV:	Intraveineux (<i>intravenous</i>)
KCl :	Chlorure de potassium (<i>potassium chloride</i>)

Kg:	Kilogramme
LDL :	Lipoprotéine de faible intensité (<i>low density lipoprotein</i>)
L-NAME :	N ^G -nitro-L-Arginine
L-NMMA:	N ^G -monomethyl-L-Arginine
LVSWI:	Travail ventriculaire gauche indexé (<i>left ventricular stroke work index</i>)
M ₁ :	Récepteur muscarinique M ₁
MAC :	Complexe d'attaque membranaire du complément composé du C6, C7, C8 et C9
MAP:	Pression artérielle systémique moyenne (<i>mean systemic blood pressure</i>)
MCP-1 :	Protéine chimiotactique monocyttaire-1
MDA :	Malondialdéhyde
mmHg:	Millimètre de mercure
MPAP:	Pression artérielle pulmonaire moyenne (<i>mean pulmonary artery pressure</i>)
NaCl:	Chlorure de sodium (<i>sodium chloride</i>)
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NaHCO ₃ :	Bicarbonate de sodium (<i>sodium bicarbonate</i>)
NE :	Norépinéphrine

NO :	Monoxyde d'azote (<i>nitric oxyde</i>)
NOS :	Synthase du monoxyde d'azote (<i>nitric oxyde synthase</i>)
NOS ₁ (nNOS):	Synthase neuronale du monoxyde d'azote (<i>neuronal nitric oxyde synthase</i>)
NOS ₂ (iNOS):	Synthase inductible du monoxyde d'azote (<i>inducible nitric oxyde synthase</i>)
NOS ₃ (eNOS):	Synthase endothéliale du monoxyde d'azote (<i>endothelial nitric oxyde synthase</i>)
O ₂ ^{•-} :	Anion superoxyde
OD :	Oreillette droite
O ₂ ER:	Ratio d'extraction d'oxygène (<i>oxygen extraction ratio</i>)
OH ⁻ :	Radicaux hydroxyls
OONO ⁻ :	Peroxynitrites
PAF :	Facteur activateur des plaquettes (<i>platelet activating factor</i>)
PaO ₂ :	Pression partielle artérielle en oxygène
PCWP:	Pression pulmonaire capillaire bloquée (<i>pulmonary capillary wedge pressure</i>)
PGE ₁ :	Prostaglandine E ₁
PGF _{2α} :	Prostaglandine F _{2α}
PGH ₂ :	Prostaglandine H ₂

PGI ₂ :	Prostaglandine I ₂ / Prostacycline (<i>prostacyclin</i>)
PGs:	Prostaglandines
PVRI:	Résistances vasculaires pulmonaires indexées (<i>pulmonary vascular resistance index</i>)
P _γ :	Récepteurs purinergiques P _γ
ROS:	Radicaux libres de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
SaO ₂ :	Saturation artérielle en oxygène (<i>arterial oxygen saturation</i>)
SEM:	Dérivation standard (<i>standard error to the mean</i>)
SIRS :	Syndrome de réponse inflammatoire systémique (<i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
SMC:	Cellules musculaires lisses (<i>smooth muscle cell</i>)
SNP:	Nitroprusside de sodium (<i>sodium nitroprusside</i>)
SOD:	Superoxyde dismutase
SR :	Réticulum sarcoplasmique
SvO ₂ :	Saturation veineuse centrale mixte (<i>mixed venous oxygen saturation</i>)
SVRI:	Résistances vasculaires systémiques indexées (<i>systemic vascular resistance index</i>)
T :	Récepteur de la thrombine T
TNFα :	Facteur de nécrose tumorale α (<i>tumor necrosis factor α</i>)

t-PA :	Activateur tissulaire du plasminogène (<i>tissue plasminogen activator</i>)
TxA ₂ :	Thromboxane A ₂
VCAM-1 :	Molécule d'adhésion aux cellules vasculaires
VO ₂ :	Consommation en oxygène (<i>oxygen uptake</i>)
VP ₁ :	Récepteur de la vasopressine VP ₁
α ₂ :	Adrénorécepteur α ₂

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Louis P. Perrault pour son excellent support et le temps qu'il a consacré à me guider et me corriger avec une justesse et une efficacité hors du commun.

Un merci tout particulier pour Marie-Pierre Mathieu, assistante de recherche, secrétaire-gestionnaire-messagère, assistante en salle d'opération, anesthésiste animalière, etc... qui a été au cœur du projet dès le tout début.

Merci aux perfusionnistes de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui ont collaboré de près ou de loin au projet pour leur disponibilité, leur professionnalisme et leur bonne humeur.

Merci à Ismaïl El-Hamamsy et Nicolas Dürrleman, confrères en chirurgie cardiaque et amis, sans qui l'année de recherche n'aurait pas été pareille.

Merci à toute l'équipe de biostatistiques de l'Institut de Cardiologie de Montréal, et plus particulièrement Annik Fortier.

Merci à tous les étudiants du laboratoire que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant cette année bien remplie : Fannie Desjardins, Olivier Malo, Marie-Ève Gendron, Martin Grant,...

En terminant, je laisse mes derniers remerciements à ma précieuse épouse, Geneviève, mes parents, mon frère et ma sœur, qui m'ont toujours encouragé durant mes longues études. Une autre étape de franchise!

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'ENDOTHÉLIUM

L'endothélium vasculaire est constitué d'une couche cellulaire unique séparant le compartiment intravasculaire du compartiment extravasculaire. De par sa position stratégique, l'endothélium remplit de nombreuses fonctions dont les principales sont : (1) le maintien d'une surface non-thrombogénique; (2) une interaction avec les cellules circulantes, facilitant ou limitant l'adhérence et l'extravasation de certaines cellules comme les neutrophiles, monocytes et lymphocytes; (3) une perméabilité sélective aux molécules circulantes, métabolites et hormones, et régulation de leur transmigration active ou passive; (4) le métabolisme de certaines substances circulantes ou produites localement, comme les prostanoïdes et la norépinéphrine; (5) la régulation de la prolifération du muscle lisse sous-jacent; et (6) la régulation du tonus vasomoteur des vaisseaux sanguins¹. La position de l'endothélium le rend vulnérable aux agressions secondaires à diverses conditions et maladies, telles que le diabète, le tabagisme, l'hyperlipidémie et l'hypertension artérielle. Une dysfonction endothéliale s'en suit et se caractérise par une atteinte des diverses fonctions de l'endothélium normal citées plus haut.

La circulation extracorporelle est utilisée quotidiennement en chirurgie cardiaque. Elle permet de dévier le sang hors du circuit cardio-pulmonaire et de pallier temporairement aux fonctions du cœur et des poumons à l'aide de pompes mécaniques et d'oxygénateurs. Le chirurgien cardio-vasculaire peut alors effectuer les interventions requises à la surface du cœur sur un cœur immobile, tel que les pontages aorto-coronariens, ou bien des interventions intracardiaques ou impliquant l'aorte thoracique et les branches de la crosse aortique. Le contact du sang avec les surfaces non-biologiques du circuit de CEC entraîne une activation en cascade des éléments figurés du sang, laquelle se traduit par une réponse inflammatoire systémique variable selon le patient, le type de circuit de CEC, la durée d'ischémie myocardique et de la perfusion extracorporelle ainsi que les solutions et médicaments utilisés pour la CEC. Cette réponse inflammatoire systémique peut entraîner un dysfonctionnement de plusieurs organes dont le cœur, les poumons, le système nerveux central, les reins et les intestins. On croit que l'endothélium joue un rôle

central dans cette réponse inflammatoire, agissant comme médiateur de la dysfonction endothéliale des artères coronaires, pulmonaires et systémiques.

Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle central dans la régulation de l'endothélium vasculaire. La tétrahydrobioptérine (BH₄) est un cofacteur essentiel dans la biosynthèse du NO et serait impliquée dans plusieurs processus pathologiques dont la maladie coronarienne, l'hypertension artérielle, le diabète et l'hypercholestérolémie.

Notre exposé traitera d'abord de la physiologie de base de l'endothélium sain et plus particulièrement de l'endothélium vasculaire des artères coronaires, puis de la physiopathologie de l'endothélium activé dysfonctionnel. Nous étudierons ensuite la physiopathologie de la CEC, la réponse inflammatoire systémique et l'atteinte de l'endothélium vasculaire des artères coronaires et ses manifestations. Enfin, nous explorerons l'effet de la tétrahydrobioptérine dans le traitement de la dysfonction endothéliale des artères coronaires secondaire à la circulation extracorporelle.

PHYSIOLOGIE ENDOTHÉLIALE NORMALE

Les propriétés de l'endothélium (cf. introduction) s'expliquent par la capacité des cellules endothéliales à percevoir les stimuli humoraux et hémodynamiques. Trois mécanismes de base les sous-tendent : (A) la sécrétion de facteurs dépendants de l'endothélium; (B) l'expression à la surface membranaire de la cellule de protéines de couplage, de molécules d'adhésion et d'enzymes; (C) et des changements morphologiques. La cellule endothéliale saine joue un rôle important dans son environnement immédiat en sécrétant une variété de substances impliquées dans le maintien du tonus vasculaire, la modulation de la coagulation et le contrôle de la prolifération du tissu environnant (Figure 1).

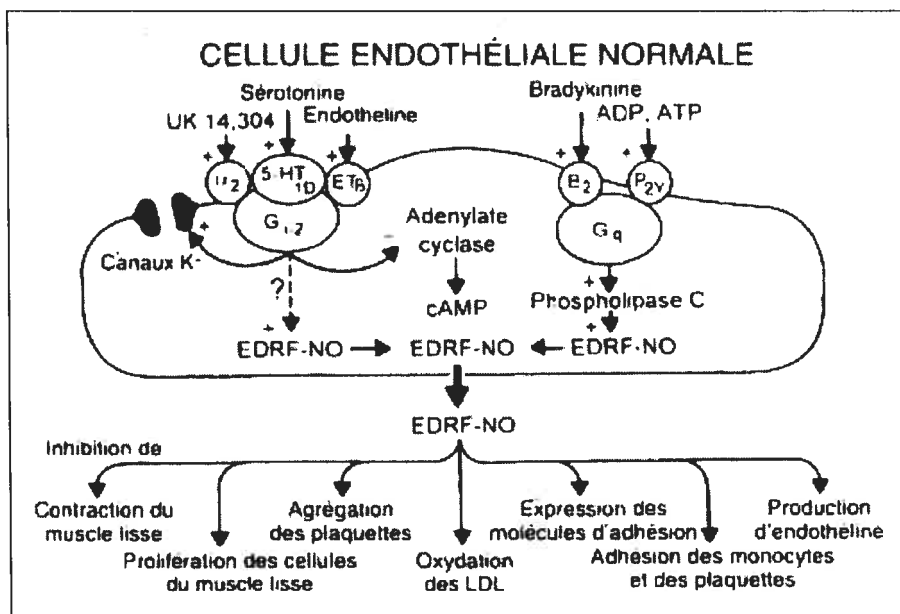


Figure 1: Processus de transduction et fonctions de l'endothélium normal. L'activation de la cellule endothéliale normale provoque la libération de facteurs relaxants de l'endothélium tel le monoxyde d'azote. Ce dernier exerce des effets protecteurs importants sur la paroi vasculaire (cf. figure). α_2 : adrénorécepteur α_2 ; $5HT_{1D}$: récepteur sérotoninergique; B_2 : récepteur à la bradykinine; ET_B : récepteur de l'endothéline; P_Y : récepteur purinergique; G : protéines-G; LDL : lipoprotéine de faible intensité. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)

Les substances vasoactives exprimées par l'endothélium sont traditionnellement classées en deux catégories : les facteurs relaxants et les facteurs contractants. Les principales substances qui entraînent une relaxation du muscle lisse sous-jacent sont le monoxyde d'azote, la prostacycline et l'EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor) (Figure 2). Les facteurs contractants sont les endothélines, la thromboxane A₂ et les radicaux libres, comme l'anion superoxyde et les endoperoxydes.

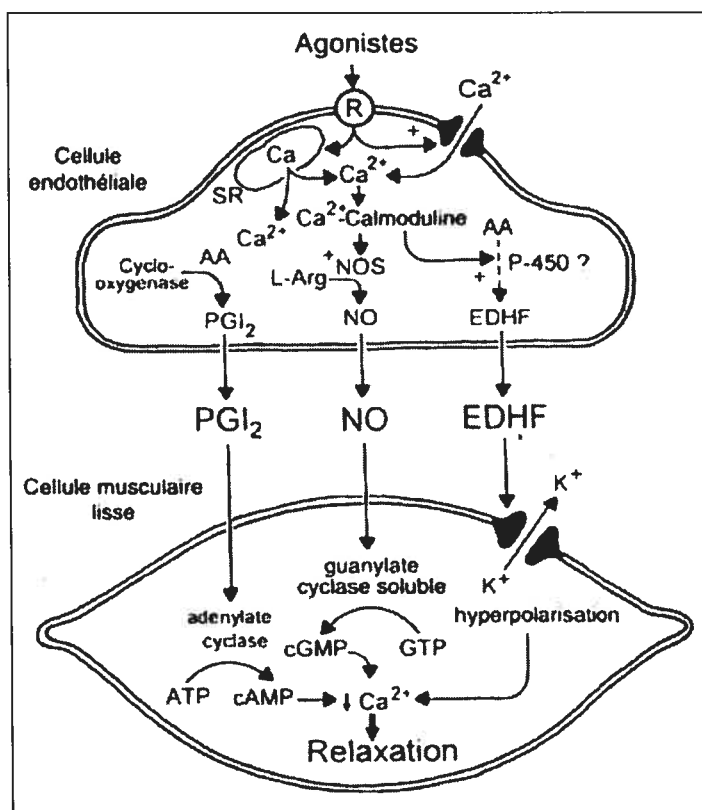


Figure 2: Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium. L'activation du récepteur endothélial (R) induit un afflux de Ca^{2+} dans le cytoplasme de la cellule endothéliale et une libération du Ca^{2+} provenant du réticulum sarcoplasmique (SR). Suite à l'interaction avec la calmoduline, le Ca^{2+} active la synthèse du monoxyde d'azote (NOS) et conduit à la formation de monoxyde d'azote (NO) et la libération du facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF). L'augmentation du Ca^{2+} accélère aussi la formation de prostacycline (PGI_2) à partir de l'acide arachidonique (AA) par la cyclooxygénase. Le NO provoque la relaxation du muscle lisse vasculaire en activant la formation de GMPc à partir du GTP. La prostacycline

provoque la relaxation en activant la formation d'AMPc à partir de l'ATP. L'EDHF provoque l'hyperpolarisation et la relaxation en ouvrant les canaux K⁺. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)

Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium

Monoxyde d'azote (NO)

La substance labile et diffusible, non prostanoïde, qui médie la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine décrite par Furchgott et Zawadski² a été identifiée comme étant le monoxyde d'azote (NO) ou un composé qui en est proche^{3,4,5,6}. Le NO est formé à partir de la portion guanidine azote terminale de la L-Arginine par une enzyme appelée NO synthase (NOS), qui est constitutive chez les cellules endothéliales normales (NOS₃⁷ ou eNOS). Cette enzyme requiert certains cofacteurs pour son activité optimale : le calcium, la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), la calmoduline, la 5,6,7,8-tétrahydroptérine (BH₄)⁸ et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). La NO synthase peut être inhibée de façon compétitive par des analogues de la L-Arginine tel que le N^G-monométhyl-L-Arginine (L-NMMA) et la N^G-nitro-L-Arginine (L-NAME). En plus de cette NO synthase constitutive présente dans les cellules endothéliales, deux autres isoformes de cette enzyme sont connues: une forme neuronale (NOS₁ ou nNOS) et une forme inductible (NOS₂ ou iNOS).

Les trois isoformes de la NOS ont des similarités structurales importantes et leur mécanisme catalytique est identique, par contre elles diffèrent de par leur localisation et leur mode d'action. La forme neuronale est exprimée dans le système nerveux et la forme endothéliale dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes⁹. Ces deux enzymes sont constitutives : elles réagissent aux agonistes qui augmentent la concentration de calcium intracellulaire, ce qui entraîne le couplage de la NOS à la calmoduline, son activation et la production de faibles

quantités de NO (10^{-9} M). La forme inductible (Type II) est indépendante du calcium et elle peut se retrouver au niveau de plusieurs types cellulaires, incluant le muscle lisse vasculaire et les macrophages. Elle est activée par les endotoxines, le facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor [TNF]), lipopolysaccharides et autres cytokines proinflammatoires^{10,11}. L'iNOS produit de grandes quantités de NO, de l'ordre du micromolaire (10^{-6} M). L'augmentation de son expression est observée dans certaines maladies systémiques comme le Syndrome de Détresse Respiratoire de l'Adulte (ARDS)¹¹, une entité clinique caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire et oedème alvéolaire, ainsi que suite à l'exposition à la circulation extracorporelle¹². Cette hausse chronique de l'expression de l'iNOS augmente les niveaux systémiques de NO, favorise la production systémique de superoxydes et peroxynitrites et entraîne une activité inflammatoire systémique accrue.

La cellule endothéliale exprime constitutivement la eNOS et produit du monoxyde d'azote suite à une cascade d'activation stimulée par des facteurs physiques ou chimiques. Les stimuli physiques sont les forces de cisaillement, l'exercice physique, l'hypoxie chronique et l'insuffisance cardiaque¹³. Les forces de cisaillement (*shear stress*) causées par l'écoulement du sang le long des parois des vaisseaux sont parmi les facteurs principaux qui régissent la production locale de NO. En effet, la vasodilatation en réaction au flot sanguin est dépendante de l'endothélium *in vivo*^{14,15}. Des études ont démontré qu'une augmentation du débit et de la pulsatilité stimule la production de NO et de prostacycline par l'endothélium des vaisseaux perfusés¹⁶. La vasoconstriction d'artères perfusées induite par l'élévation de la pression endoluminale peut être supprimée par la destruction de l'endothélium, ce qui suggère une production diminuée de NO^{17,18}.

De nombreux médiateurs neurohumoraux peuvent entraîner la libération de NO par une activation de récepteurs endothéliaux spécifiques (Figure 3).

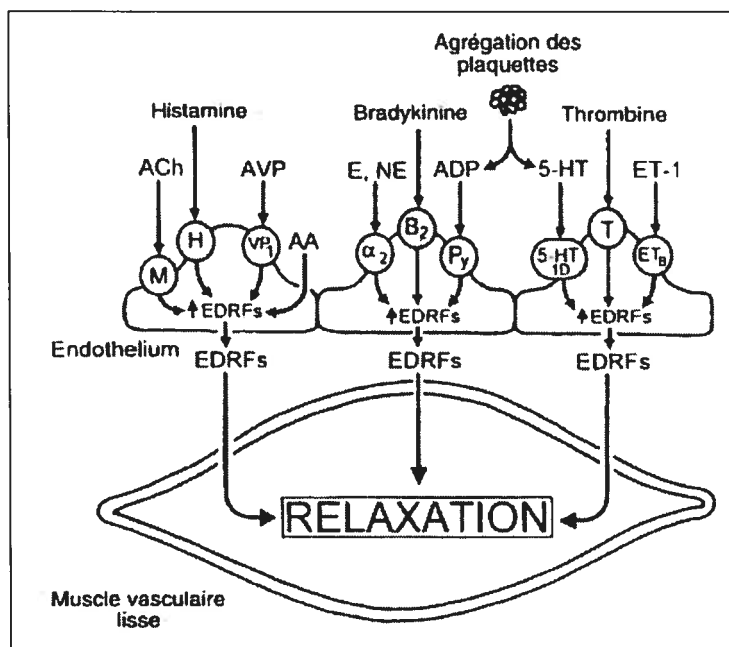


Figure 3: Médiateurs neurohumoraux menant à la sécrétion de facteurs vasorelaxants (EDRF). AA : acide arachidonique; Ach : acétylcholine; ADP : adénosine diphosphate; α_2 : adrénorécepteur α_2 , AVP : arginine vasopressine; B_2 : récepteur de la bradykinine; E : épinéphrine; ET_B : récepteur de l'endothéline; H : récepteur de l'histamine; $5HT_{1D}$: récepteur sérotoninergique; M : récepteur muscarinique; NE : norépinéphrine; P_y : récepteur purinergique; T : récepteur de la thrombine; VP_1 : récepteur de la vasopressine. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)

Ces substances endogènes capables de stimuler la relâche de NO sont soit des hormones circulantes (catécholamines, vasopressine), des autacoïdes générés au niveau de la paroi vasculaire (bradykinine, histamine), des médiateurs produits par les plaquettes (sérotonine, adénosine diphosphate [ADP]) ou formés lors de la cascade de coagulation (thrombine)^{5,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29}. Les récepteurs pour ces composés sont en relation avec la production de NO par différentes protéines de couplages. Par exemple, dans les cellules endothéliales porcines, les récepteurs α_2 -adrénergiques, sérotoninergiques et à la thrombine sont couplés à des protéines-Gi sensibles à la toxine de la coqueluche (cf Figure 1, page 4). Aussi, les récepteurs

purinergiques P_1 et B_2 à la bradykinine sont couplés à des protéines-Gq qui ne sont pas sensibles à la toxine de la coqueluche^{30,31} (cf Figure 1, page 4). Les récepteurs membranaires, les protéines-G et les protéines kinases nécessaires à la transduction du signal sont situés à la surface des cellules endothéliales dans des invaginations de surface appelées cavéoles. Ces cavéoles contiennent un échantillon des agonistes présents à l'extérieur de la cellule endothéliale afin de stimuler les récepteurs appropriés.

Le NO diffuse vers les cellules du muscle lisse vasculaire et cause leur relaxation par la stimulation d'une enzyme cytosolique, la guanylate cyclase soluble, qui entraîne une augmentation de 3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique). Cette dernière est associée avec l'inhibition de l'appareil contractile (Figure 4).

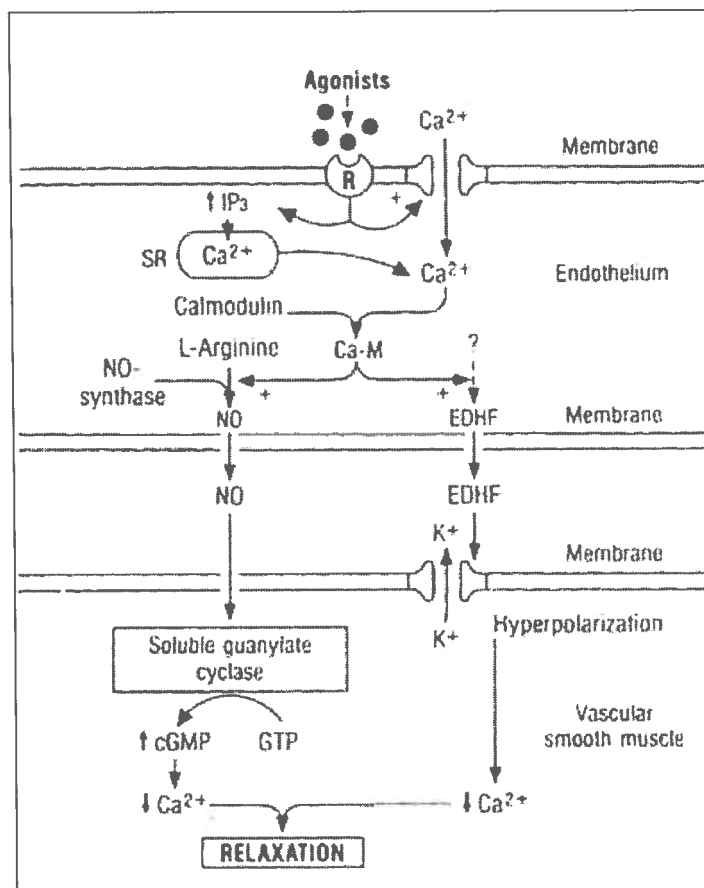


Figure 4: Mécanisme menant à la relaxation du muscle vasculaire lisse. Ca^{2+} : calcium; Ca-M : calcium+calmoduline; EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium; cGMP : guanosine monophosphate cyclique; IP3 : inositol triphosphate; K^+ : canaux potassiques; NO : monoxyde d'azote; R : récepteur endothélial; SR : réticulum sarcoplasmique. (Tiré de : Boulanger C, Vanhoutte PM. The endothelium: a pivotal role in health and cardiovascular disease. Servier, 1994.)

La production de NO contribue de façon importante aux relaxations dépendantes de l'endothélium dans les artères isolées, incluant les artères coronaires, systémiques, mésentériques, pulmonaires et cérébrales. Sa contribution significative *in vivo* est suggérée par l'observation que des inhibiteurs de NO synthase causent une vasoconstriction dans la plupart des lits vasculaires à la fois chez les animaux et les humains^{4,28}.

Les cellules endothéliales secrètent le NO non seulement vers le muscle lisse vasculaire sous-jacent mais aussi dans la lumière du vaisseau sanguin. Dans des circonstances normales, la présence d'oxyhémoglobine dans les érythrocytes neutralise immédiatement le NO, qui joue un rôle physiologique uniquement à l'interface entre les cellules endothéliales et le sang. Le NO inhibe l'adhésion endothéliale des plaquettes et leucocytes. Il agit en synergie avec la prostacycline afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire^{3,4,20,26,32}. Aussi, les substances produites durant l'agrégation plaquettaire sont d'importants producteurs de NO entraînant une relaxation dépendante de l'endothélium et inhibant significativement la vasoconstriction induite par la thromboxane A_2 et la sérotonine, toutes deux dérivées des plaquettes. Le NO inhibe localement la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires et inhibe la relâche de mitogènes et hormones de croissance^{33,34,35,36}.

En présence d'un endothélium normal, les substances dérivées des plaquettes telles que la sérotonine et l'adénosine diphosphate (ADP), agissent sur les récepteurs endothéliaux $5\text{HT}_{1\text{D}}$ -sérotoninergiques et P_γ -purinergiques pour diminuer le risque d'occlusion vasculaire par vasorelaxation et inhibition de l'adhésion-agrégation

plaquettaire. Lorsque la continuité de l'endothélium est atteinte (lésion vasculaire), la sérotonine et la thromboxane A_2 agiront cette fois-ci directement sur le muscle lisse vasculaire pour entraîner une vasoconstriction et occlusion du vaisseau. Ceci constitue la phase vasculaire de l'hémostase^{3,24,26,37}. La présence de l'iNOS est accrue suite aux dommages vasculaires. On pense que cette expression augmentée pourrait limiter la réponse thrombotique et proliférative suite aux lésions vasculaires³⁸.

Prostacycline (PGI_2)

La prostacycline est produite suite à l'activation successive de la phospholipase A_2 , de la cyclooxygénase et de la prostacycline synthétase³⁹. Cette réaction se produit généralement au niveau des cellules endothéliales – mais aussi dans la média et l'adventice des vaisseaux – en réponse aux forces de cisaillement, à l'hypoxie et à plusieurs médiateurs qui entraînent la libération de NO. Sa production est dépendante de la libération d'ions calciques des réserves intracellulaires. La prostacycline lie les récepteurs à la prostacycline sur l'endothélium qui activeront l'adénylate cyclase et augmenteront la production intracellulaire de 3'-5'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique) lequel stimulera les canaux potassiques dépendants de l'ATP entraînant ainsi une hyperpolarisation et relaxation du muscle lisse vasculaire⁴⁰. En plus de son action vasodilatatrice, la prostacycline cause une inhibition importante de l'agrégation plaquettaire⁹.

Dans la plupart des lits vasculaires, la contribution de la prostacycline à la relaxation dépendante de l'endothélium est négligeable et ses effets sont essentiellement additifs à ceux du NO. En effet, le GMPc formé suite à la stimulation par le NO joue un effet inhibiteur endogène de la phosphodiesterase qui dégrade l'AMPc⁴⁰. Ainsi, le NO augmente la durée de vie du second messager de la prostacycline. Le NO et la prostacycline ont cependant un effet synergique important au niveau de l'agrégation plaquettaire⁴¹.

Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium (EDHF)

Des études électrophysiologiques au niveau des artères coronaires humaines ont démontré que l'acétylcholine, la bradykinine et d'autres dilatateurs dépendants de l'endothélium entraînent une relaxation du muscle lisse vasculaire en présence d'inhibiteurs de la synthèse du NO et de la prostacycline. Cette relaxation est accompagnée d'une hyperpolarisation de la membrane cellulaire du muscle vasculaire lisse^{42,43,44,45}. La nature chimique de ce « facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium » (EDHF) demeure matière à spéculation. L'EDHF est produit principalement par le cytochrome P-450 CYP₉^{46,47}. Sa production dépend de la présence de calcium intracellulaire et est inhibée par les agonistes de la calmoduline⁴⁸. Il est diffusible et atteint le muscle lisse vasculaire. Il active des canaux potassiques calcium-dépendants, probablement indépendants de l'ATP⁴⁹, via une liaison au récepteur muscarinique M₁⁴⁸.

La contribution de l'hyperpolarisation à la relaxation dépendante de l'endothélium varie en fonction de la taille de l'artère et est plus importante dans les vaisseaux de résistance. Dans les artères de gros calibre, le NO contribue davantage que l'EDHF aux relaxations de l'endothélium, mais lorsque le NO est inhibé, l'EDHF peut mener à des relaxations quasi normales. Des concentrations élevées de NO inhibent la production de l'EDHF⁵⁰. Ainsi, l'EDHF pourrait jouer un rôle important lorsque la voie du NO est atteinte, mais ce rôle en situation pathologique demeure mal défini⁵¹.

En résumé, les principaux facteurs relaxants dérivées de l'endothélium sont le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Le NO contribue de façon importante à la relaxation du muscle lisse vasculaire via une augmentation intracellulaire du guanosine monophosphate cyclique (GMPc).

Facteurs contractants dérivés de l'endothélium

Dans certaines circonstances, l'endothélium peut initier une vasoconstriction par la libération de substances diffusibles^{52,53,54,55}. Les contractions dépendantes de l'endothélium peuvent s'expliquer par l'inhibition des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) ou par la production de facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCF). Les EDCF identifiés jusqu'à présent incluent l'endothéline-1, la thromboxane A₂ et les radicaux libres⁵⁶. L'endothéline est la plus susceptible de jouer un rôle dans la modulation à long terme du tonus vasculaire et de la structure plutôt que dans la régulation momentanée du degré de vasoconstriction du muscle lisse vasculaire^{57,58,59,60,61}. Les stimuli pour la vasoconstriction dépendante de l'endothélium incluent l'hypoxie, les stimuli physiques tels que la pression et l'étirement ainsi que de nombreux médiateurs neurohumoraux (Figure 5).

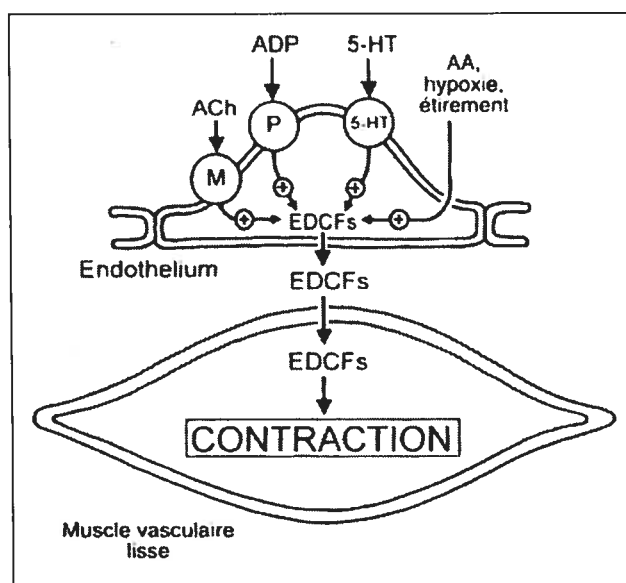


Figure 5 : Facteurs contractants dérivés de l'endothélium (EDCF). AA : acide arachidonique; Ach : acétylcholine; ADP : adénosine diphosphate; 5HT : sérotonine et récepteur sérotoninergique; M : récepteur muscarinique; P : récepteur purinergique. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)

Endothélines

L'endothéline est un puissant facteur contractant dérivé de l'endothélium⁵⁷. Trois isoformes différentes de l'endothéline existent, mais seule l'endothéline-1 (ET-1) est synthétisée par l'endothélium. La synthèse d'endothéline-1 est stimulée et régulée par plusieurs facteurs. Les forces de cisaillement constituent un important stimulant de la synthèse d'ARNm d'endothéline. L'angiotensine II et plusieurs cytokines entraînent aussi une sécrétion d'endothéline. Deux types de récepteurs à l'endothéline sont décrits à ce jour : les récepteurs ET_A et ET_B⁶². Dans le lit vasculaire, les récepteurs ET_A sont présents sur le muscle lisse vasculaire et leur stimulation entraîne une vasoconstriction. Les récepteurs ET_B sont situés sur l'endothélium et leur stimulation entraîne une sécrétion de vasodilatateurs comme le NO et la prostacycline. Le rôle de l'endothéline-1 dans le tonus vasculaire est donc complexe, mais l'utilisation simultanée de bloqueurs de l'ET_A et de l'ET_B entraîne une chute des résistances vasculaires systémiques, ce qui suggère un rôle actif dans le maintien du tonus vasculaire basal⁶³.

Les donneurs de NO, comme le nitroprussiate de sodium, inhibent les contractions dépendantes de l'endothéline-1⁶⁴. Ainsi, de basses concentrations d'endothéline induisent la stimulation de l'ET_B, stimulant la production de NO et la dilatation^{63,65}. Une haute concentration d'endothéline active l'ET_A, causant une constriction⁶⁶. Si l'endothéline est produite en très grandes quantités, une production importante de NO mènera à une diminution de la production d'ET-1⁶⁷. Ce système de rétroaction négatif est non seulement dépendant du NO, mais aussi de la prostacycline et de l'EDHF⁶⁷. Donc en résumé, l'effet de l'endothéline est modulé par la quantité d'endothéline produite et par l'action d'agents antagonistes tels le NO.

Thromboxane A₂

Le métabolisme de l'acide arachidonique par la cellule endothéliale peut mener à la sécrétion de prostaglandine H₂ (PGH₂), cette prostaglandine est le produit précurseur de tous les prostanoïdes, dont la thromboxane A₂ (TxA₂)⁶⁸. La production de PGH₂ et de TxA₂ induit une vasoconstriction suite à l'activation des récepteurs aux endoperoxydes et à la thromboxane. Leur action diminue la dilatation engendrée par la stimulation à l'acétylcholine⁶⁹. Le fait que la prostacycline soit produite en beaucoup plus grande quantité par la cyclooxygénase renverse l'effet de ces vasoconstricteurs. Ils ont donc peu d'impact en physiologie normale. La thromboxane A₂ cause aussi une augmentation de l'agrégation plaquettaire. Le rôle de la thromboxane semble être prédominant en situation d'hémorragie, où la vasoconstriction et l'agrégation causés par la thromboxane A₂ aident à l'hémostase.

Radicaux libres

Les cellules endothéliales sécrètent des radicaux libres en réponse aux forces de cisaillement et à d'autres agonistes endothéliaux comme la bradykinine⁷⁰. Les radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyl (OH⁻) chélatent le monoxyde d'azote dérivé de l'endothélium, causant ainsi une dysfonction endothéliale⁷¹. L'anion superoxyde (O₂⁻) se lie au NO pour former les peroxynitrites, ceux-ci se décomposent en radicaux hydroxyls, causant une peroxydation des lipides, un des mécanismes par lesquels se produisent des dommages oxydatifs⁷². Les peroxydes de lipides induisent une activation de la phospholipase A₂, qui entraîne l'expression de molécules d'adhésion, la sécrétion de médiateurs proinflammatoires et de cytokines, qui mèneront ultimement à un roulement, une adhésion et une migration des leucocytes et une sécrétion d'enzymes toxiques pour l'endothélium⁷³.

En résumé, le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle central dans la régulation du tonus vasculaire de l'endothélium normal en équilibre avec la sécrétion d'autres facteurs relaxants et contractants. L'endothélium maintient une surface non-thrombogénique grâce à la synthèse de NO et de prostacycline. Lors d'une hémorragie, une sécrétion prédominante de thromboxane A₂ par les plaquettes entraîne une vasoconstriction et une agrégation plaquettaire. L'endothélium sécrète aussi les facteurs de croissance nécessaires à la reconstruction des structures endommagées.

L'ENDOTHÉLIUM DYSFUNCTIONNEL

L'endothélium devient dysfonctionnel lorsque les fonctions qu'il accomplit normalement sont perturbées. Ce dysfonctionnement se manifeste par une chute de la synthèse et de la sécrétion du NO et autres facteurs vasodilatateurs (EDRF) et/ou une plus grande prédisposition aux facteurs vasoconstricteurs. L'expression accrue de molécules d'adhésion et la sécrétion de facteurs de croissance et cytokines dérivés de l'endothélium sont d'autres manifestations caractéristiques de l'endothélium dysfonctionnel. Plusieurs conditions peuvent altérer le fonctionnement normal de l'endothélium tels l'athérosclérose, le vieillissement, l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque. Plusieurs mécanismes physiopathologiques ont été décrits. Le dommage initial peut être de nature oxydative, ischémique ou physique. Soumis chroniquement à ces insultes endothéliales, la sécrétion de facteurs dépendants de l'endothélium sera altérée. Ces altérations mèneront à un déséquilibre des facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs, une perte des propriétés anti-thrombogéniques, et une sécrétion de facteurs de croissance qui stimuleront la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (Figure 6).

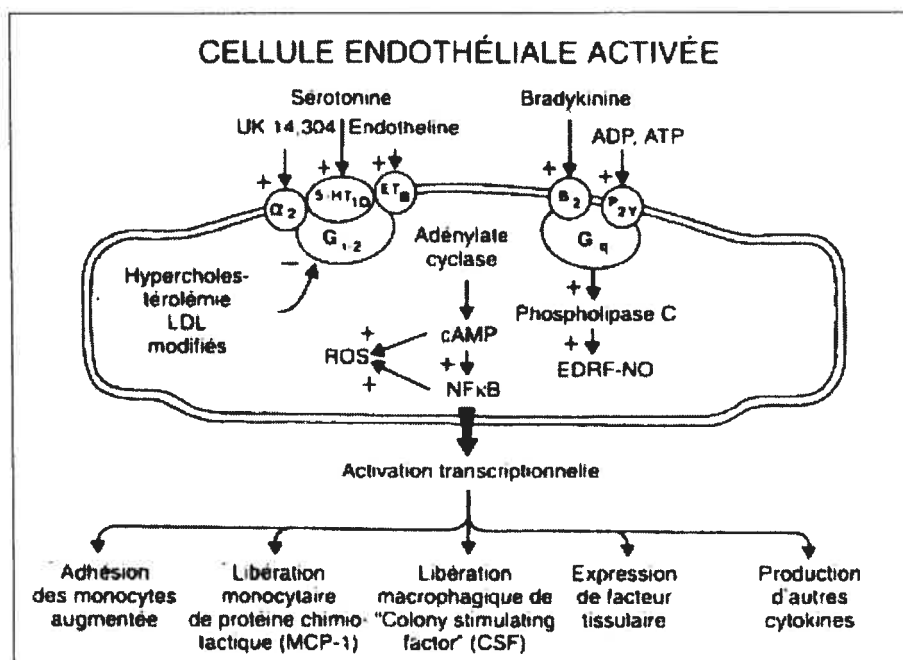


Figure 6 : Endothélium dysfonctionnel. Altération de la transduction des signaux dépendant des protéines-G avec diminution de la libération de monoxyde d'azote (NO). Aussi, l'augmentation de l'AMPc active le facteur de transcription NFκB qui induit un état de stress oxydatif dans la cellule endothéliale. α₂ : adrénorécepteur α₂; 5HT_{1D} : récepteur sérotoninergique; B₂ : récepteur à la bradykinine; ETB : récepteur de l'endothéline; G : protéines-G; LDL : lipoprotéine de faible intensité; Pγ : récepteur purinergique; ROS : radicaux libres de l'oxygène. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)

L'athérosclérose est une cause importante de la dysfonction endothéliale. Les principaux facteurs de risque connus d'athérosclérose sont le vieillissement, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le diabète sucré, le tabagisme et la prédisposition génétique à cette maladie. L'association de ces facteurs de risque favorise un état de stress oxydatif élevé favorisant l'adhésion et la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial, leur transformation en macrophages et finalement la formation de cellules spumeuses (*foam cells*). Ces cellules spumeuses se gorgent de lipides pour favoriser éventuellement le développement de plaques lipidiques, lésions typiques de l'athérosclérose. Des études coronarographiques chez l'humain ont montré que les artères coronaires avec lésions athérosclérotiques se contractaient suite à l'injection d'acétylcholine par son effet constricteur direct sur le muscle lisse, alors que l'acétylcholine produit habituellement une vasodilatation par stimulation de la voie endothéliale du NO chez les patients normaux⁷⁴. Cette dysfonction endothéliale survient même en l'absence d'épaississement intimal et constituerait un événement précoce de l'athérogénèse^{75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87}. **Au stade précoce de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale apparaît limitée à la voie du NO dépendante des protéines-Gi** (stimulée par la sérotonine, les agonistes alpha2-adrénérgiques, les plaquettes en agrégation et la thrombine) qui sont sensibles à la toxine de la coqueluche.

L'endothélium régénéré issu du processus normal de vieillissement présente un autre exemple de la dysfonction endothéliale. La durée de vie normale des

cellules endothéliales est d'environ trente ans. Les cellules qui remplacent l'endothélium natif sont moins fonctionnelles, notamment la sécrétion de substances relaxantes est diminuée. En effet, l'endothélium régénéré présente une réponse de vasodilatation altérée à la sérotonine et aux autres substances utilisant la voie sensible à la toxine de la coqueluche (protéines-Gi). L'expression des protéines-Gi est similaire à celle de l'endothélium natif, mais leur activité est diminuée. Ainsi, la relaxation qui suit l'agrégation plaquettaire, lors de laquelle de grandes quantités de sérotonine, de thrombine et d'ADP sont sécrétées, est diminuée dans l'endothélium régénéré, avec une sécrétion diminuée de NO⁸⁸. Dans ces cas, les sites vasculaires recouverts d'endothélium régénéré sont plus à risque d'être le siège de vasoconstriction exagérée et de thrombose. La perte de cette réponse sensible à la toxine de coqueluche est sélective et ne s'applique pas aux réponses dépendantes de l'endothélium à l'ADP ou à la bradykinine (associé aux protéines-Gq, insensible à la toxine de la coqueluche)⁸⁹.

Un autre modèle clinique important de dysfonction endothéliale est la circulation extracorporelle (CEC). Les caractéristiques de la CEC et de la réponse inflammatoire systémique secondaire à la CEC seront couvertes dans les prochaines sections.

PRINCIPES DE BASE DE LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE

La circulation extracorporelle fut introduite au début des années 50 et a marqué le début de la chirurgie cardiaque moderne. Plusieurs modifications et améliorations ont rendus cette technologie plus simple, accessible et moins morbide. Elle permet au chirurgien de travailler sur un coeur en asystolie avec des poumons dégonflés et un champ opératoire exsangue. Le sang du patient est recueilli par une canule veineuse au niveau de l'oreillette droite, dirigé par gravité ou aspiration assistée (*vacuum-assist*) vers le circuit extracorporel où il sera oxygéné, filtré, réchauffé ou refroidi, puis renvoyé vers le système artériel par une canule au niveau de l'aorte ascendante⁹⁰. Le sang ainsi dévié évite la circulation pulmonaire et les chambres cardiaques. La ventilation mécanique peut aussi être cessée étant donné que le sang est oxygéné et déchargé de son CO₂ par l'oxygénateur (Figure 7).

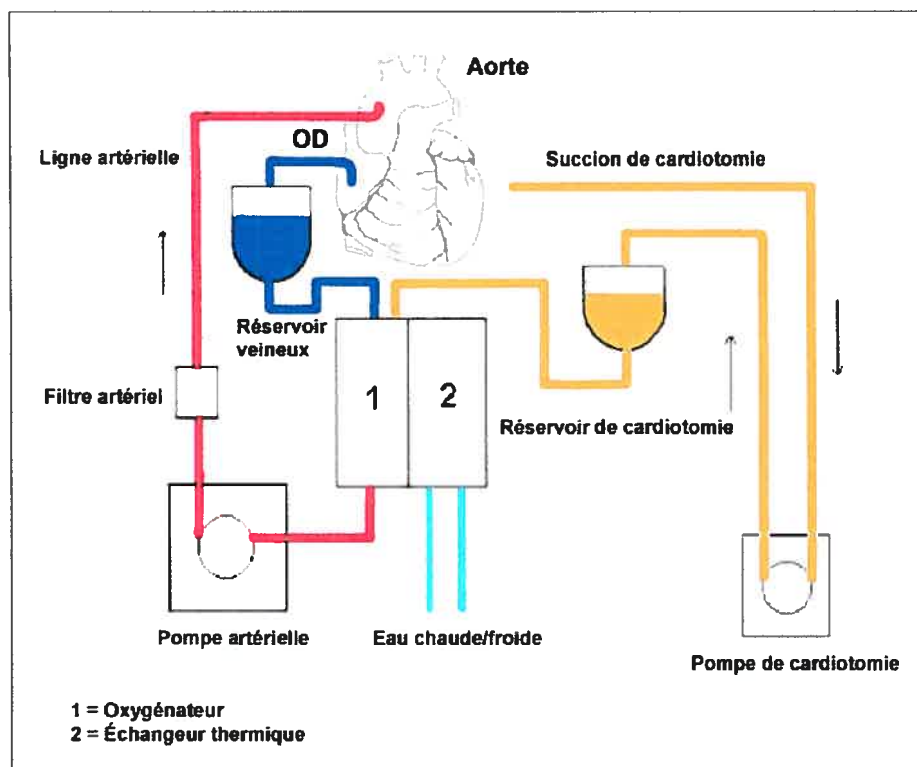


Figure 7: Circuit de circulation extracorporelle. OD : oreillette droite.

ATTEINTE ORGANIQUE MULTISYSTÉMIQUE ET CIRCULATION EXTRACORPORELLE (CEC)

La circulation extracorporelle et la chirurgie cardiaque par sternotomie médiane exposent le sang aux biomatériaux du circuit de circulation extracorporelle et aux cellules non endothéliales de la plaie. Normalement, les cellules sanguines et protéines circulantes interagissent seulement avec l'endothélium, lequel est conçu pour maintenir la fluidité du sang et l'intégrité du système vasculaire. Les cellules endothéliales accomplissent ce double rôle en produisant à la fois des substances anticoagulantes et procoagulantes pour maintenir l'équilibre entre les formes liquides et gélatineuses du sang. Le contact avec des surfaces non endothélialisées, telles que biomatériaux (circuit de CEC), membrane basale, membrane cellulaire ou matrice, favorise la thrombose.

Héparine

La circulation extracorporelle n'est actuellement pas réalisable sans anticoagulation. Bien que d'autres anticoagulants aient été utilisés avec succès dans d'autres circonstances (i.e. allergie à l'héparine)^{91,92,93}, la circulation extracorporelle requiert de fortes concentrations d'héparine durant la perfusion pour maintenir la fluidité du sang. L'héparine a un début d'action rapide et peut être renversée avec la protamine ou le facteur plaquettaire recombinant-4⁹⁴. L'héparine n'inhibe pas directement la coagulation mais agit indirectement en accélérant l'action naturelle de l'antithrombine, un inhibiteur de protéase. L'antithrombine se lie principalement à la thrombine et ses effets sur les facteurs Xa et IXa sont beaucoup plus lents et négligeables durant la circulation extracorporelle. Ainsi, l'héparine inhibe la coagulation à la fin de la cascade après que la plupart des protéines de la coagulation aient été transformées sous leur forme active. L'héparine active également plusieurs autres éléments sanguins : plaquettes^{95,96,97}, facteur XII⁹⁸, système du complément, neutrophiles et monocytes^{99,100,101}.

Lorsque le sang hépariné entre en contact avec les biomatériaux, les protéines plasmatiques sont rapidement (<1 sec) adsorbés à la surface des biomatériaux pour former une monocouche de cellules (Figure 8).

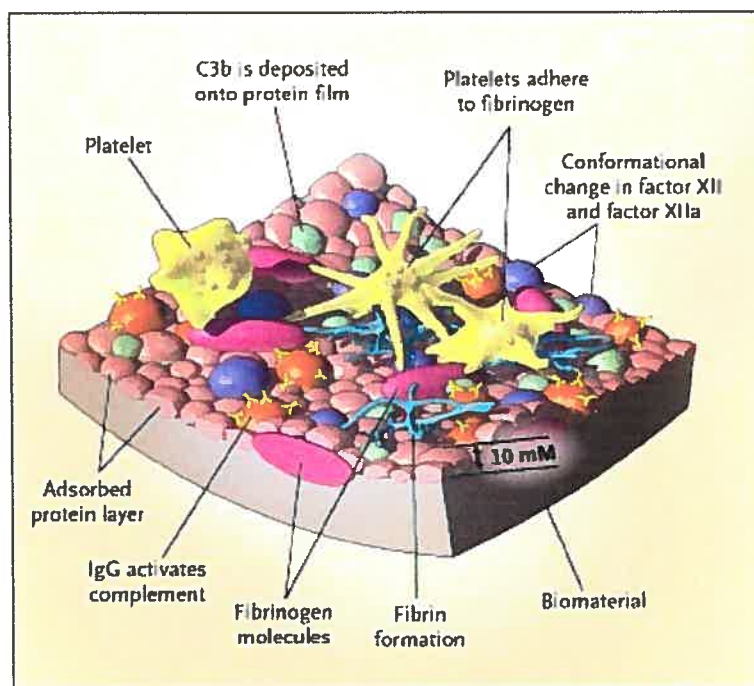


Figure 8. Interaction des protéines plasmatiques avec les biomatériaux. (Tiré de : Edmunds LH. Cardiopulmonary bypass after 50 years. N Engl J Med 2004;351:1603-1606.)

L'attraction de chaque protéine est déterminée par ses caractéristiques intrinsèques et celle des biomatériaux. Les protéines adsorbées sont entassées, immobiles et peuvent présenter des changements de conformation limités pouvant exposer des récepteurs de surface, lesquels seront reconnus par des protéines ou cellules circulantes telles que le facteur XII, le C3 et les plaquettes^{102,103}. Ces réactions complexes à la surface des biomatériaux modifient la composition du sang circulant, entraînant une réponse de la part de cellules endothéliales de tout l'organisme (réaction inflammatoire systémique à la circulation extracorporelle)¹⁰⁴.

Réponse inflammatoire systémique à la circulation extracorporelle

La CEC entraîne une réponse inflammatoire de tout l'organisme ou syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS)^{105,106,107,108,109,110,111,112,113} associée à une altération de la fonction normale de l'endothélium¹¹⁴. Dans sa forme la plus sévère, un éventail d'insultes peut être observé incluant une ou plusieurs des manifestations cliniques suivantes : dysfonctionnement pulmonaire, rénal, gastro-intestinal, neurologique et/ou myocardique; coagulopathie; vasoconstriction; perméabilité capillaire accrue; vasodilatation systémique; accumulation de liquide interstitiel; hémolyse; pyrexie; et une susceptibilité accrue aux infections et à la leucocytose^{115,116,117}. Heureusement, la plupart des patients qui subissent des opérations sous CEC ne présenteront pas de séquelles cliniquement significatives. Les réponses inflammatoires, de thrombose et d'hémorragie secondaires à la CEC impliquent principalement cinq systèmes de protéines sanguines (système de protéines de contact, coagulation intrinsèque et extrinsèque, fibrinolyse et complément) et cinq types cellulaires (plaquettes, cellules endothéliales, neutrophiles, monocytes et lymphocytes) (Figure 9).

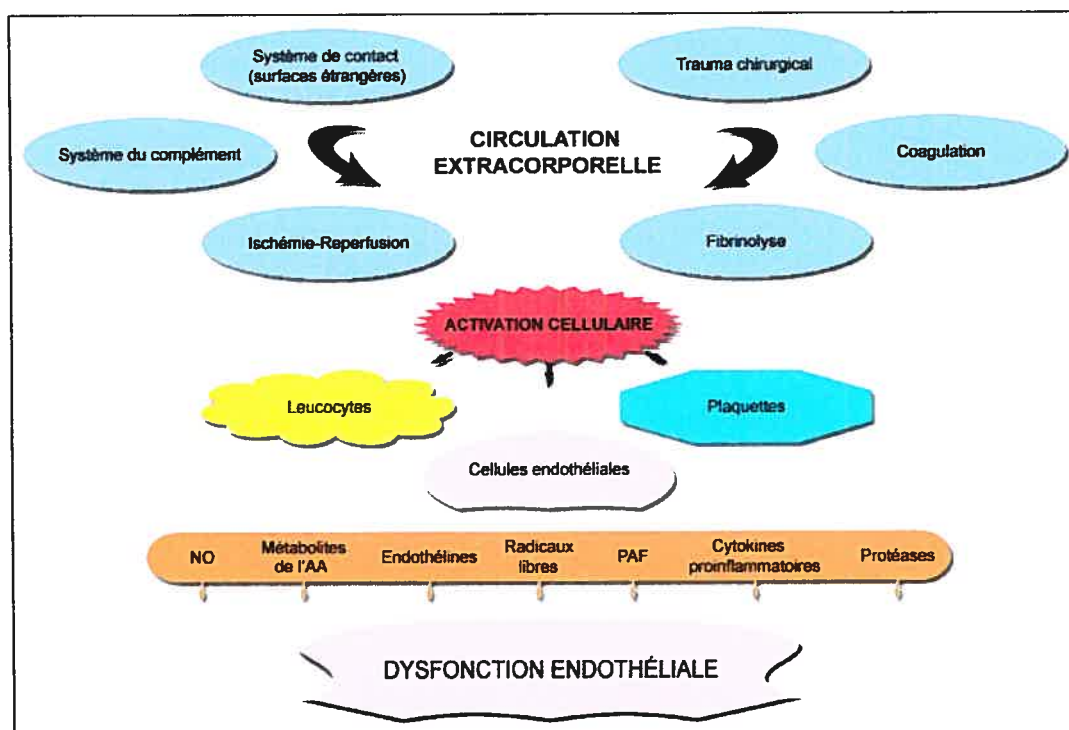


Figure 9 : Réponse inflammatoire systémique à la CEC. AA : acide arachidonique; NO : monoxyde d'azote; PAF : facteur activateur des plaquettes.

Plusieurs médiateurs cellulaires sont altérés durant la CEC. Ceux-ci comprennent des hormones, autacoïdes, cytokines, électrolytes, anaphylotoxines et substances paracrines. Ces substances sont impliquées dans la réponse inflammatoire secondaire à la CEC. La concentration respective de ces substances varie selon les études, les modèles animaux vs humains, les types de circuits utilisés et les durées de circulation rendent difficile la compréhension des relations complexes entre médiateurs et les cellules cibles durant la CEC. Plusieurs substances restent également à découvrir.

Système de contact

Il consiste en 4 protéines : facteur XII (facteur d'Hageman), prékallikréine, kininogène de haut poids moléculaire (HMWK) et le facteur XI. Après le contact avec la surface du biomatériau, le facteur XII subit des changements de conformation et lie le HMWK. Ce complexe protéolytique (facteur XIIa et HMWK) transforme la prékallikréine en kallikréine et le HMWK en bradykinine (vasodilatateur à courte action) pour ensuite relâcher le facteur XIIa qui agit en boucle de rétroaction positive. Le facteur XIIa – en présence de kallikréine et HMWK – transforme également le facteur XI en facteur XIa, activant ainsi la cascade de coagulation intrinsèque (voir plus bas). La kallikréine active les neutrophiles et la cascade inflammatoire favorisant ainsi la production de radicaux libres et d'enzymes protéolytiques. La kallikréine et la bradykinine stimulent le système fibrinolytique : la kallikréine favorise la production de plasmine et la bradykinine entraîne la relâche de l'activateur tissulaire du plasminogène par l'endothélium.

Voies de coagulation intrinsèque, extrinsèque et commune

La voie de coagulation intrinsèque implique l'activation successive des facteurs IX, VIII, X et V entraînant l'activation de la voie commune de coagulation qui assure la transformation de la prothrombine en thrombine. Le facteur tissulaire initie la voie de coagulation extrinsèque en activant le facteur VII en facteur VIIa lequel se combine avec les facteurs Va, calcium et la surface phospholipide pour transformer le facteur X en facteur Xa et ainsi activer la voie commune de coagulation (Figure 10).

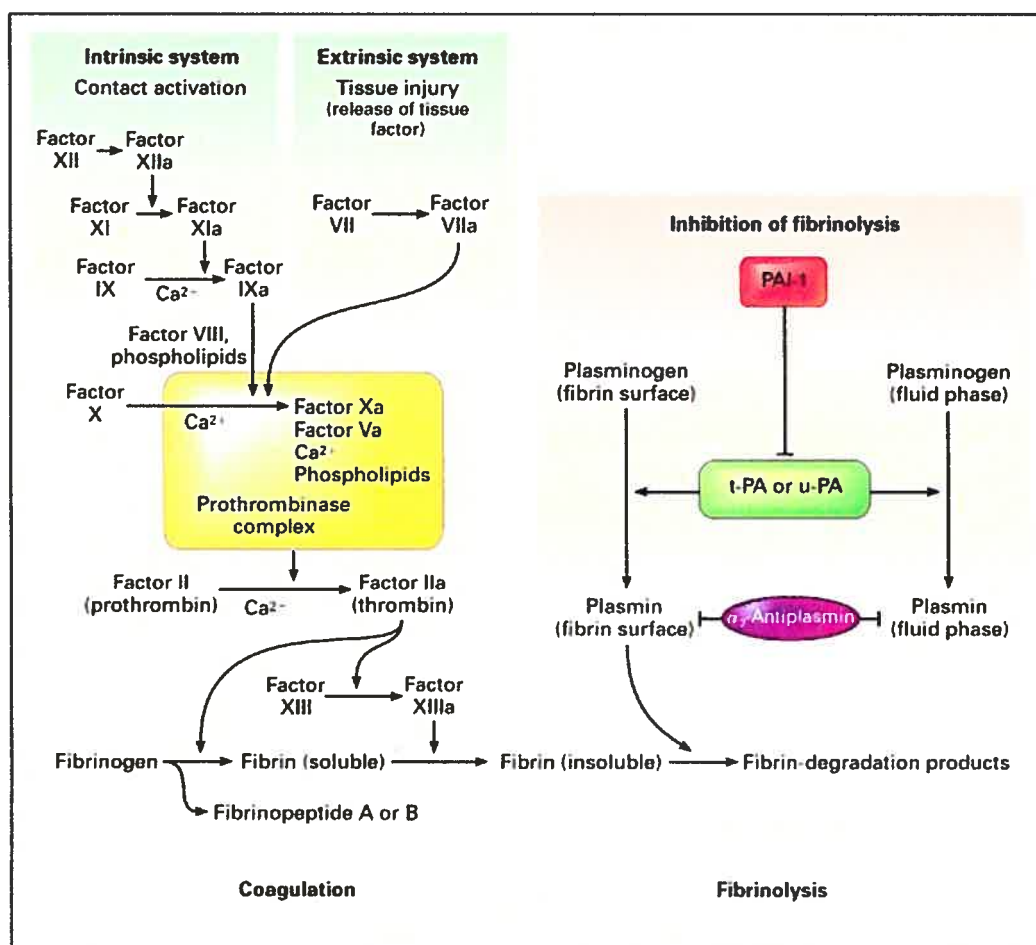


Figure 10. Voies de coagulation et de fibrinolyse. Les principales voies de la coagulation sont subdivisées en système intrinsèque et extrinsèque. L'activation

du facteur XII au contact d'une surface chargée négativement initie le système de coagulation intrinsèque (la forme activée des facteurs de la coagulation est indiquée par un « a »). Le système de coagulation extrinsèque induit la formation d'un complexe constitué du facteur VI et du facteur tissulaire, lequel est relâché suite à un traumatisme tissulaire. Quelques unes de ces réactions dépendent des ions calciques. La thrombine est formée par un complexe enzymatique appelé prothrombinase, composé du facteur X, du facteur V, de phospholipides chargés négativement et d'ions calciques. Les voies d'activation intrinsèque et extrinsèque de la cascade de la coagulation mènent à la formation de thrombine, l'activation du fibrinogène, la relâche de fibrinopeptides, la formation de fibrine soluble et finalement à la formation de fibrine insoluble par le facteur XIII. Les principales réactions fibrinolytiques impliquent l'inhibition de la fibrinolyse par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène type 1 (PAI-1) et de l' α -antiplasmine. La fibrinolyse est initiée par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), l'activateur du plasminogène de type urinaire (u-PA) et la plasmine. La plasmine se lie à la surface de la fibrine pour initier la lyse de la fibrine insoluble avec la formation secondaire de produits de dégradation de la fibrinolyse. La plasmine liée à la surface de la fibrine est mieux protégée de l'inhibition par l' α -antiplasmine que la plasmine circulante. (Tiré de : Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;342:1792-1801.)

Le facteur tissulaire est une protéine liée à la membrane qui est exprimée constitutionnellement par plusieurs types de cellules incluant l'adventice vasculaire, la graisse, le muscle, l'épicarde, les monocytes activés et les cellules endothéliales^{118,119,120}. La voie de coagulation intrinsèque est activée principalement dans le circuit de circulation extracorporelle alors que la voie de circulation extrinsèque prédomine dans la plaie¹¹⁹.

Fibrinolyse

La thrombine circulante active les cellules endothéliales à produire l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), lequel se lie fermement à la fibrine¹²¹. Le t-PA transforme le plasminogène en plasmine lequel dégrade la fibrine (Figure 10, ci haut). La fibrinolyse est stimulée par la CEC. Elle est normalement contrôlée par des protéases inhibitrices natives (α_1 -antiplasmine, α_2 -macroglobuline et l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène), lesquelles sont soit exprimées en faible quantité durant la circulation extracorporelle ou ont une action lente.

Système du complément

Le système du complément est un des principaux mécanismes immunologiques du processus inflammatoire secondaire à la CEC. Il consiste en plus de 30 protéines impliquées dans la réponse immunitaire et le système primaire de reconnaissance du soi et du non soi. Ses fonctions comprennent la médiation de la réponse inflammatoire, l'opsonisation des particules antigéniques et l'attaque des membranes des agents pathogènes. Les composantes du complément interagissent entre elles, si bien qu'une réaction en entraîne une autre résultant en une amplification importante du stimulus initial (phénomène de cascade). Près de la moitié des protéines du complément sont des molécules régulatrices impliquées dans le contrôle serré de cette amplification en cascade.

Le système du complément est activé à la fois par les voies classique et alterne durant la circulation extracorporelle. Le contact avec la surface du circuit de circulation extracorporelle active la voie classique du complément (reconnaissance antigène-anticorps) via le C1, C2 et C4 pour ensuite dégrader le C3 en C3a et C3b⁹⁹. La voie alterne est une voie primitive de rétroaction positive impliquant l'activation successive des facteurs B et D par le facteur C3b entraînant la dégradation du C3 (Figure 11).

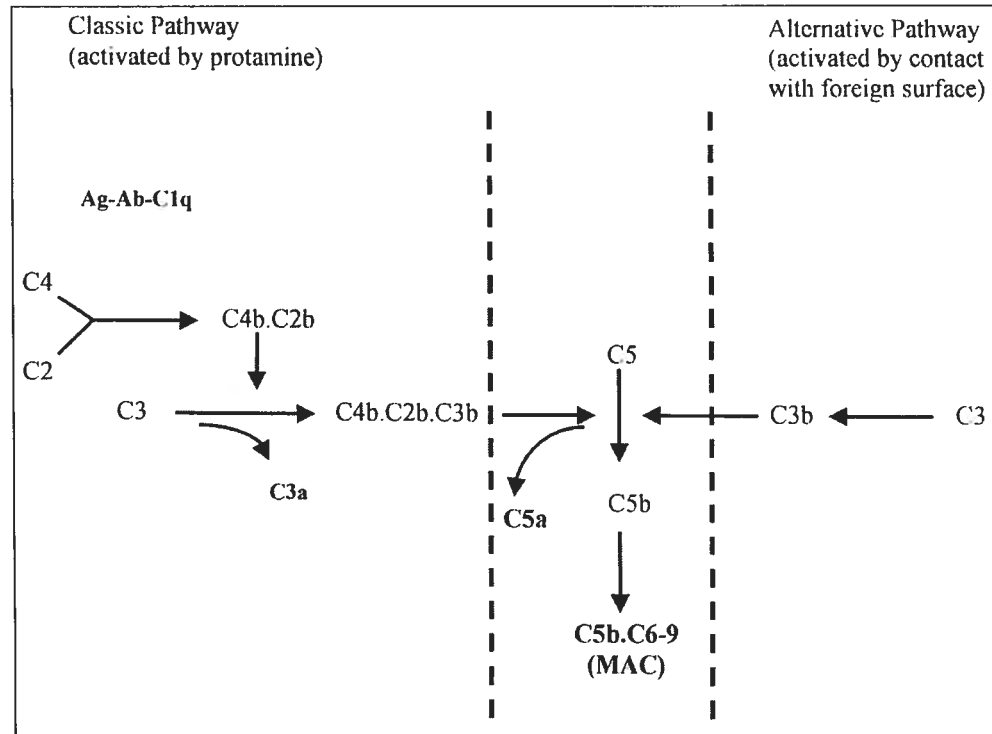


Figure 11. Système du complément : voies classique et alterne. MAC : complexe d'attaque membranaire. (Tiré de : Asimakopoulos G, Smith PLC, Ratnatunga CP, Taylor KM. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg 1999;68:1107–15.)

Puisque la voie alterne est amplifiée par le C3b, elle constitue la principale voie impliquée durant la circulation extracorporelle. À la fin de la circulation extracorporelle, le système du complément est activé fortement de nouveau lorsque l'héparine est neutralisée par la protamine. Le voie commune finale du complément, ou voie lytique, dans laquelle le C3b est l'enzyme active qui transforme le C5 en C5a et C5b et finit par former le complexe d'attaque membranaire du complément (MAC) composé du C6, C7, C8 et C9. Le MAC entraîne la formation de canaux transmembranaires au niveau des membranes phospholipides des cellules par un effet toxique direct. Ceci rend la cellule incapable de maintenir son équilibre osmotique et biochimique et cause la lyse ou mort cellulaire¹²². Les anaphylotoxines C3a, C4a et C5a ont des propriétés vasoconstrictrices directes, augmentent la perméabilité

vasculaire et entraînent la dégranulation des mastocytes et basophiles et la relâche de nombreux médiateurs de l'inflammation dont l'histamine. Le C5a est un agoniste important des neutrophiles (chémotaction, activation) entraînant la relâche d'enzymes lysosomiales, de radicaux libres de l'oxygène et autres médiateurs inflammatoires¹²³.

Plaquettes

Les plaquettes normales ont pour fonction d'adhérer aux cellules endothéliales endommagées ou aux couches sous-endothéliales pour préserver l'hémostase et l'intégrité des vaisseaux sanguins. L'adhérence est obtenue par des ponts formés entre les molécules multimériques du facteur von Willebrand endothélial et les récepteurs glycoprotéiques plaquettaires G1b. Les plaquettes sont activées durant la circulation extracorporelle par le contact de surface, l'héparine, le facteur activateur des plaquettes (PAF), mais surtout la thrombine circulante, un agoniste puissant se liant à des récepteurs plaquettaires spécifiques¹²⁴. L'héparine augmente la sensibilité des plaquettes aux agonistes solubles⁹⁵, inhibe sa liaison avec le facteur von Willebrand⁹⁷ et augmente modérément les temps de saignement^{95,96}. La circulation extracorporelle active les plaquettes via d'autres agonistes dont le complément (C5b-9)¹²⁵, la plasmine^{126,127}, l'hypothermie^{128,129}, l'interleukine-6¹³⁰, la cathepsine G, la sérotonine et l'épinéphrine.

Activées, les plaquettes subissent des changements de conformation, expriment les récepteurs glycoprotéines GIIb/IIIa, surexpriment le G1b^{131,132} et sécrètent, dans des granules α , des récepteurs P-sélectine solubles et liés¹³³. Les récepteurs GIIb/IIIa lient presque instantanément les plaquettes et le fibrinogène, ce dernier servant de pont entre les plaquettes, entraînant l'agrégation plaquettaire^{134,135}. L'agrégat plaquettaire est stabilisé par un complexe de protéines thrombospondines. Des études ont démontrées que les plaquettes de patients déficients en complexe GIIb/IIIa ne se lient pas aux surfaces des biomatériaux du circuit de CEC¹³⁶,

suggérant que le complexe GPIIb/IIIa est la principale glycoprotéine d'adhésion associée à l'activation et agrégation plaquettaire secondaire à la CEC. Grâce à leurs récepteurs P-sélectine, les plaquettes forment également des agrégats avec les monocytes et neutrophiles^{133,137}. L'adhésion plaquettaire au circuit de circulation extracorporelle et la formation d'agrégats plaquettaire réduit le taux de plaquettes circulantes, lequel est déjà réduit par la dilution entraînée par les solutions d'amorce (*priming*) du circuit extracorporel.

Les plaquettes activées sécrètent plusieurs facteurs et protéines à partir de leur granules incluant la thromboxane A_2 ¹³⁸, le facteur plaquettaire 4, la β -thromboglobuline¹³⁹, la P-sélectine¹³³, la sérotonine, l'adénosine diphosphate et triphosphate, du calcium, des mitogènes, des hydrolases acides¹⁴⁰ et des protéases neutres (Figure 12).

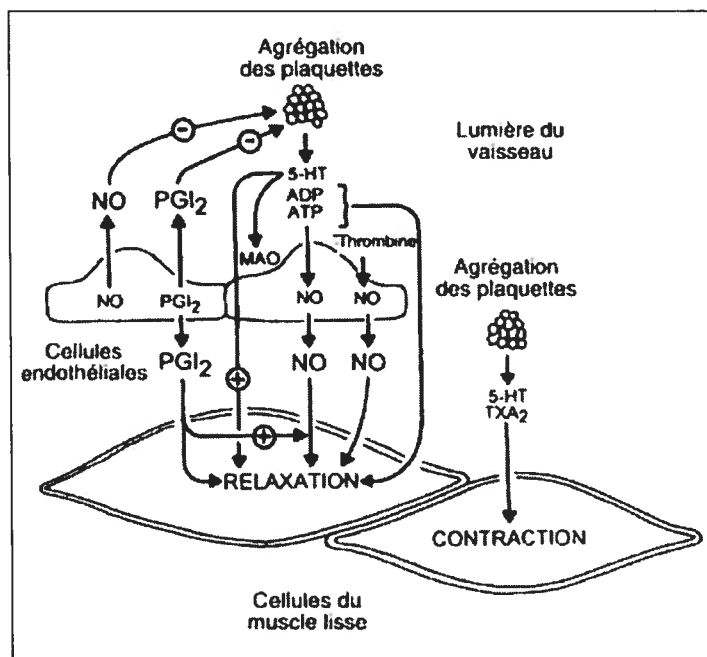


Figure 12 : Interaction entre les produits plaquettaires, la thrombine et l'endothélium.

Si l'endothélium est intact, plusieurs substances libérées des plaquettes, telles que l'adénosine diphosphate et triphosphate (ADP, ATP) et la sérotonine (5HT), ainsi que la thrombine, provoquent la libération de prostacycline (PGI_2) et de monoxyde d'azote (NO). La PGI_2 et le NO libérés relaxent le muscle lisse vasculaire sous-jacent et sont également

libérés vers la lumière du vaisseau sanguin pour prévenir l'adhésion/agrégation plaquettaire. L'endothélium agit comme barrière physique empêchant l'accès au muscle lisse des produits plaquettaires vasoconstricteurs, tels que la 5HT et la thromboxane A₂ (TXA₂), lesquels sont impliqués dans la phase vasculaire de l'hémostase lors d'un traumatisme endothélial. (Tiré de : Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. Archives des maladies du cœur et des vaisseaux 1997; 90:9-19.)

La thromboxane A₂ est un produit de dégradation de l'acide arachidonique de courte demi-vie qui contribue à la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire et favorise le dysfonctionnement pulmonaire¹⁴¹ et myocardique¹⁴² après la CEC. Les prostaglandines comme la prostacycline (PGI₂) et la prostaglandine E₁ ont des effets antagonistes à la thromboxane, mais ne sont pas sécrétées de façon préférentielle lors de la CEC.

Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont activées durant la circulation extracorporelle par une multitude d'agonistes dont la thrombine, le C5a, diverses cytokines telles l'interleukine-1 et le facteur de nécrose tumorale (TNF)¹⁴³, l'hypoxie et les radicaux libres de l'oxygène, et les lipopolysaccharides (endotoxines). Les cellules endothéliales produisent la PGI₂, du sulfate d'héparane, les protéases thrombomoduline et nexin-1 – toutes deux impliquées dans la suppression de la thrombine –, la protéine S – laquelle accélère les propriétés anticoagulantes de la protéine C –, l'inhibiteur du facteur tissulaire – lequel contrôle la voie extrinsèque de la coagulation –, et le t-PA. Les cellules endothéliales produisent des substances vasoactives dilatatrices ou constrictrices (voir ci-haut). L'activation de l'endothélium entraîne l'expression rapide de protéines de surface de la famille des sélectines ainsi que du facteur tissulaire (procoagulant) (Figure 13).

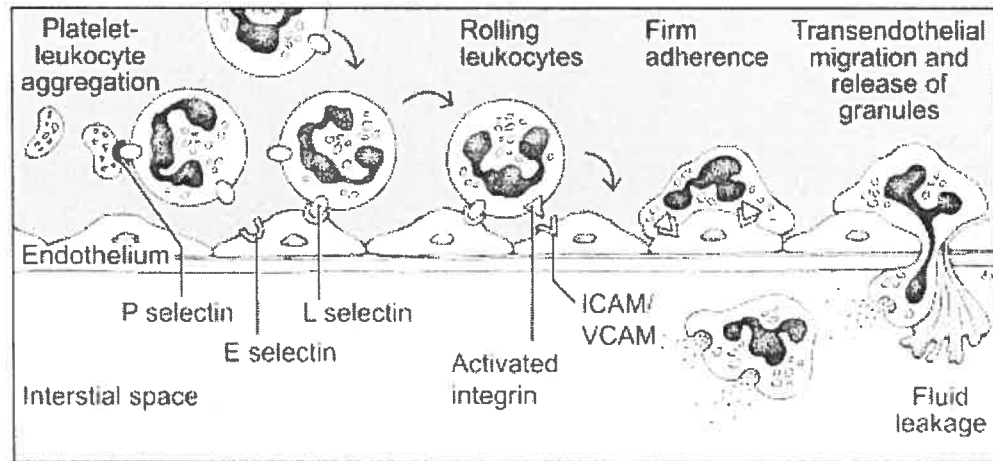


Figure 13. Interactions entre les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes. (Tiré de : Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation : pathophysiology and treatment – An update. Eur J Cardiothor Surg 2002;21:232-244.)

La première à être exprimée est la P-sélectine, laquelle est mise en réserve et préformée dans des corps de Weibel-Palade qui seront relâchés par exocytose quelques minutes après l'activation endothéliale par l'histamine, la thrombine, les radicaux libres ou le C5a. Celle-ci est suivie par l'expression de la E-sélectine. Les protéines et les P-sélectine/E-sélectine sont impliquées dans l'adhésion et la transmigration des neutrophiles dans l'espace extravasculaire. Les VCAM-1 (molécule d'adhésion aux cellules vasculaires) et ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire) sont des immunoglobulines exprimées par les cellules endothéliales servant de ligand pour les récepteurs CD11b/CD18 sur les neutrophiles et monocytes^{143,144}.

Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un facteur relaxant dérivé de l'endothélium qui inhibe la coagulation et l'adhésion plaquettaire. Le NO a une courte durée d'action et est produit de façon continue par l'endothélium intact. Durant la CEC, la

forme inductible de NO synthase (iNOS) produit de grandes quantités de NO pouvant entraîner une vasoplégie, c'est-à-dire une vasodilatation difficilement réversible. La diminution d'expression de NO synthase de type endothélial (eNOS) est liée au développement d'hypertension pulmonaire durant la CEC par la chute de production constitutive de NO en réponse aux forces de cisaillement.

Endothéline

L'endothéline est un vasoconstricteur endogène puissant sécrété de façon prédominante vers la fin de la CEC¹⁴⁵ de façon proportionnelle à la durée de la CEC¹⁴⁶. Par la hausse de pression artérielle qu'elle engendre, la postcharge myocardique et donc le travail ventriculaire gauche sont augmentés. Dans un contexte d'apport sanguin limité, cette surcharge de travail peut mener à de l'ischémie myocardique et éventuellement à la nécrose myocardique¹⁴⁷.

Neutrophiles

Les neutrophiles sont fortement activés durant la circulation extracorporelle. Ceux-ci sont particulièrement sensibles aux forces de cisaillement qui causent la destruction ou l'altération des fonctions des neutrophiles dont une diminution de leur capacité d'agrégation, de migration chimotactique et de phagocytose¹⁴⁸. Les neutrophiles sont activés via leurs interactions avec l'endothélium vasculaire dysfonctionnel et sont responsables de plusieurs des séquelles du syndrome de réponse inflammatoire secondaire à la CEC. L'activation de l'endothélium vasculaire par la CEC entraîne l'expression de molécules d'adhésion favorisant l'adhérence des neutrophiles, lesquels peuvent alors relâcher des protéases cytotoxiques et radicaux libres de l'oxygène (Figure 13). L'activation endothéliale systémique affecte les neutrophiles sur une large échelle, rendant les mécanismes de contrôle locaux impuissants à contrôler l'ampleur de la réaction.

Les principaux agonistes des neutrophiles sont la kallikréine et le C5a, lesquels sont produits par les systèmes de contact et du complément, respectivement^{149,150}. Les autres agonistes actifs durant la circulation extracorporelle comprennent le facteur XIIa, l'héparine, le leucotriène B₄, l'interleukine-1 β , l'interleukine-8, le TNF et le PAF. Durant la circulation extracorporelle, les neutrophiles endommagent l'endothélium en relâchant des protéases neutres (élastase), des enzymes lysosomiales, des myéloperoxydases, du peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxyls, de l'acide hypochloridrique, de l'acide hypobromeux, des hydrolases acide, et des collagénases¹⁵¹. Les neutrophiles jouent un rôle important dans les lésions d'ischémie-reperfusion et le syndrome de réponse inflammatoire associé à la CEC.

Monocytes

Les monocytes activés expriment le facteur tissulaire, à la fois dans la plaie et le circuit de CEC^{119,152}. Le sang en contact avec le champ opératoire atteint de hautes concentrations de facteur VIIa, de produits de dégradation de la prothrombine et de monocytes exprimant le facteur tissulaire. Le retour de ce sang dans le circuit de CEC par la succion de cardiectomie augmente donc l'expression du facteur tissulaire dans le circuit. La balance entre les cytokines anti-inflammatoires (interleukine-10) et inflammatoires affecte le degré d'activation des monocytes circulants et leur expression du facteur tissulaire.

Le nombre de monocytes circulants n'augmente pas durant la CEC, mais il augmente par la suite pour atteindre un plateau 20 heures après l'intervention^{153,154,155}. Les récepteurs cellulaires monocytaires [CD11b/CD18, MCP-1 (protéine chimiotactique monocyttaire-1), L-sélectine^{143,156}] sont surexprimés à la fin de la CEC et le facteur tissulaire est fortement exprimé 20 heures après l'opération¹⁵⁷. Les monocytes forment des agrégats avec les plaquettes¹³³. Les autres agonistes monocytaires comprennent le C5a, les complexes immuns, les

endotoxines et les interleukine-1 et 1β . Les monocytes produisent une variété de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire à la CEC, particulièrement l'interleukine- 1β , l'interleukine-6 et le $TNF-\alpha$ ^{153,154}.

Lymphocytes

Le nombre de cellules B et T ainsi que la réponse des lymphocytes aux mitogènes et autres agonistes est réduite durant les premières semaines suivant la CEC^{158,159,160}. Cette diminution implique les cellules B, CD4+ (assistant/inducteur), CD8+ (cytotoxique/suppresseur)^{161,162} ainsi qu'une augmentation du ratio CD8+/CD4+^{154,160}. La production d'interleukine-2 et d'interferon- α ^{154,162} et l'expression des récepteurs d'interleukine-2¹⁵⁸ sont réduites. Ces changements sont indépendants des transfusions sanguines¹⁶¹ et signalent une diminution de la réponse immunitaire.

Forces de cisaillement et Érythrocytes

Des forces de cisaillement (*shear stress*) sont générées par le passage répété du sang dans le circuit de CEC, les pompes à galets ou centrifuges, les succions de cardiectomie et de vidange ventriculaire, ainsi que par la cavitation générée autour de l'extrémité de la canule aortique. Les érythrocytes sont endommagés durant la CEC par les forces de cisaillement¹⁶³ ce qui altère leur déformabilité. La déformabilité érythrocytaire réduite affecte le flot tissulaire, les propriétés rhéologiques du sang et la concentration des pompes ioniques à la surface des érythrocytes avec accumulation de cations intracellulaires¹⁶⁴. Les membranes des érythrocytes sont attaquées par le complexe d'attaque membranaire (MAC) généré par l'activation du complément¹¹⁵. La durée de vie des érythrocytes est donc réduite. La destruction des érythrocytes entraîne la relâche de plusieurs produits dont : l'hémoglobine libre qui affecte la fonction des tissus en augmentant la pression oncotique plasmatique et

sa viscosité; des radicaux libres de l'oxygène cytotoxiques par autooxydation de l'hémoglobine; de l'ADP/ATP qui affectent l'activité des plaquettes; et du potassium qui augmente la susceptibilité aux arythmies. De plus, les membranes lipidiques des érythrocytes lysés en circulation peuvent occlure les petits vaisseaux et mener à des atteintes multisystémiques.

L'ischémie-reperfusion

Les radicaux libres de l'oxygène sont responsables en grande partie des lésions d'ischémie-reperfusion. La lésion ischémique survient lorsque l'apport sanguin tissulaire est réduit ou suboptimal, lequel peut survenir durant la CEC. On parle du paradoxe de l'ischémie-reperfusion lorsqu'une lésion d'ischémie encore plus sévère survient au moment de la reperfusion. Le début de l'ischémie est marqué par une déplétion des réserves cellulaires d'adénosine triphosphate en raison de sa dégradation par l'hypoxanthine. Normalement, l'hypoxanthine est oxydée en xanthine par l'enzyme xanthine déshydrogénase, une réaction nécessitant la conversion de NAD en NADH. Durant la période d'ischémie par contre, la xanthine déshydrogénase est convertie en xanthine oxydase. Le métabolisme anaérobique entraîne la production d'acide lactique et altère l'homéostasie cellulaire avec une perte des gradients ioniques transmembranaires.

La lésion de reperfusion est amorcée par une série d'évènements biochimiques résultant en la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène. La diminution de l'oxygène entraîne la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) par les neutrophiles notamment $[O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}]$ lequel est apte à pénétrer les membranes cellulaires où il est transformé en élément dérivé de l'oxygène encore plus toxique. L'anion superoxyde peut réagir avec la superoxyde dismutase (SOD) pour former du peroxyde d'hydrogène $[HO_2^{\cdot} + O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2]$. Aussi, **des changements de structure du NO, notamment en présence de niveaux insuffisants de tétrahydrobioptérine, peuvent mener à la production de peroxynitrites ($OONO^{\cdot}$)**

$[\text{NO} + \text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{OONO}^-]$ ¹⁶⁵, lesquels sont hautement toxiques pour l'endothélium¹⁶⁶ (Figure 14).

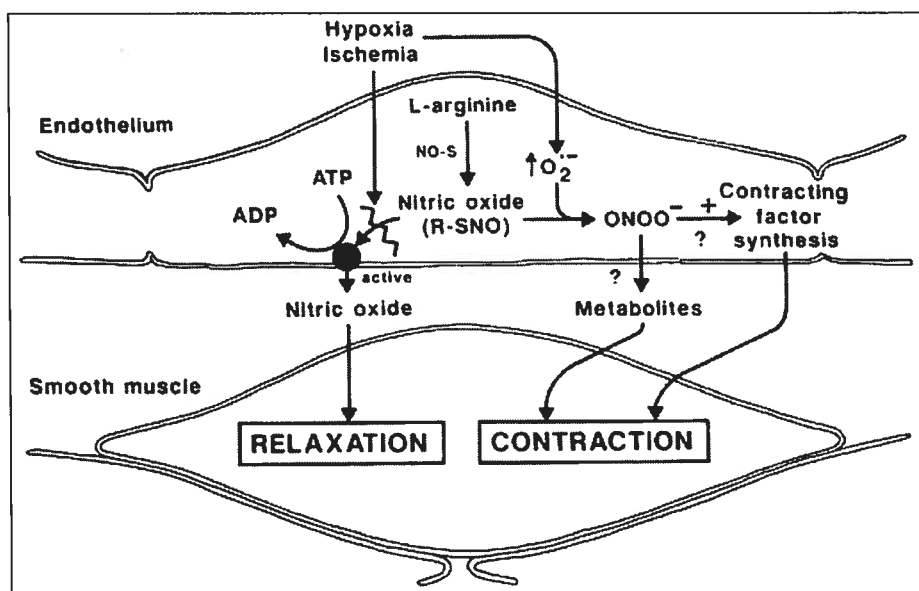


Figure 14. Ischémie-reperfusion et formation de radicaux libres de l'oxygène au lieu du monoxyde d'azote et état de déplétion de tétrahydrobioptérine. ADP/ATP : adenosine di/triphosphate; NO : monoxyde d'azote; NO-S: synthase du monoxyde d'azote; $\text{O}_2^{\cdot -}$: anion superoxyde; ONOO^- : peroxynitrites. (Tiré de : Seccombe JF, Schaff HV. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. Ann Thorac Surg 1995;60:778-788.)

Le peroxyde d'hydrogène peut mener à la production d'acide hypochloridrique par l'action des myéloperoxydases $[\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HOCl}]$ ou via l'interaction avec les sels de fer (réaction Haber-Weiss : $[\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}]$) pour produire des radicaux hydroxyls (OH^\cdot) hautement toxiques réagissant avec plusieurs autres molécules. Il est bien démontré que la circulation extracorporelle entraîne une hausse sérique des oxydases, telles les myéloperoxydases, et des produits de dégradation des radicaux libres. L'un de ces produits est le malondialdéhyde (MDA), un produit de dégradation des lipides qui augmente de façon marquée dans le sang après la CEC¹⁶⁷.

Les radicaux libres de l'oxygène affectent les fonctions et la réactivité endothéliale sur plusieurs plans. L'anion superoxyde cause une vasoconstriction excessive par un effet de stimulation direct des cellules musculaires lisses vasculaires¹⁶⁶. Les radicaux libres peuvent agir comme chélateurs du NO sécrété à partir des cellules endothéliales¹⁶⁸. Les peroxynitrites (OONO⁻) à haute concentration sont directement cytotoxiques par nitrosylation des résidus tyrosine. Durant la CEC, les périodes prolongées de flot non pulsatile, les arrêts circulatoires et le choc cardiogénique peuvent entraîner une ischémie diffuse des organes cibles^{109,169}. Cette lésion ischémique entraîne la relâche de cytokines et radicaux libres de l'oxygène par les cellules endothéliales, les macrophages et les monocytes tels que décrit ci-haut.

Deux autres sources importantes de radicaux libres dans la genèse de la dysfonction de l'endothélium vasculaire sont : (1) la eNOS dysfonctionnelle disposant de quantités insuffisantes de tétrahydrobioptérine (BH₄) ou de L-arginine et (2) les NADPH oxydases¹⁷⁰. L'administration exogène de BH₄ inhibe la production de O₂⁻ par la eNOS dysfonctionnelle, rétablit la production de NO et corrige la dysfonction endothéliale. Les NADPH oxydases génèrent de grandes quantités de radicaux libres et sont exprimées dans plusieurs types cellulaires non phagocytaires, incluant les cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire, les fibroblastes et les cardiomyocytes. L'expression et/ou l'activité des NADPH oxydases peuvent être stimulées par de nombreux stimuli dont l'angiotensine II, le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et les forces de cisaillement. Tous ces mécanismes sont opérationnels en situation de CEC.

Endotoxémie

L'endotoxémie est une autre cause d'ischémie-reperfusion. Les endotoxines sont produites par des bactéries gram négatives. Elles sont détectées en haute concentration dans la circulation systémique après la CEC¹⁷¹. Les endotoxines sont

des stimulateurs puissants des cellules endothéliales, du complément et des macrophages. Le mécanisme de l'endotoxémie suivant la CEC est inconnu, mais on croit que les endotoxines proviendraient de la translocation de bactéries au niveau des intestins durant les épisodes de stress et de l'ischémie splanchnique associé à une dysfonction des cellules de Kupffer^{172,173}. Les endotoxines ont un effet vasoplégique systémique (chute des résistances systémiques comme dans le sepsis) ainsi qu'un effet inotropique négatif causé par désensibilisation des récepteurs adrénergiques β_1 ou par une réaction couplée aux protéines-Gs et protéines-Gi chez le rat¹⁷⁴. Cette endotoxémie est un des principaux activateurs du complément et de formation de $\text{TNF}\alpha$.

Ainsi, la circulation extracorporelle engendre une réaction majeure qui touche plusieurs systèmes simultanément. Durant cette dysfonction multisystémique, l'endothélium est une des cibles de choix. L'endothélium coronaire et pulmonaire subit plusieurs altérations pendant et après la CEC. L'ischémie est plus marquée au niveau de l'endothélium pulmonaire, le sang étant dévié du lit vasculaire pulmonaire (bien que perfusés minimalement par les artères bronchiques systémiques). Les forces de cisaillement, l'altération de la rhéologie du sang, la non pulsatilité, les périodes d'instabilité hémodynamique et les arrêts circulatoires affectent la qualité de perfusion des lits vasculaires coronaires et périphériques. L'endothélium coronaire reçoit un sang oxygéné, mais chargé de cytokines proinflammatoires. Après la CEC, l'endothélium coronaire subit un stress oxydatif important dû à la production de radicaux libres suite à la reperfusion des territoires ischémiques avec du sang oxygéné. Bien que la base moléculaire de la dysfonction endothéliale secondaire à la circulation extracorporelle ne soit pas complètement élucidé, le mécanisme central pourrait être la diminution de l'activité biologique du NO et/ou de sa biosynthèse. Le rétablissement de niveaux normaux de NO dans les artères affectées est un but thérapeutique majeur et pourrait être atteint à l'aide de plusieurs classes de médicaments dont les donneurs de NO, la L-Arginine, la tétrahydrobioptérine (BH₄), les statines, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antioxydants et l'hormonothérapie de remplacement en oestrogènes¹⁷⁵. La BH₄ représente une approche prometteuse dans la prévention et le traitement de la dysfonction endothéliale. Les caractéristiques du BH₄ sont décrites dans la section suivante et son effet sur la dysfonction endothéliale des artères coronaires porcines fait l'objet de l'étude présentée au Chapitre III.

EFFETS DE LA TÉTRAHYDROBIOPTÉRINE

La 5,6,7,8-tétrahydroptérine (BH₄) est un cofacteur important des hydrolases aromatiques aminoacides¹⁷⁶ ainsi que des trois isoformes de la NO synthase⁸. La BH₄ aide à stabiliser la forme dimérique active de la NO synthase en augmentant son affinité pour la L-Arginine et en dirigeant le flot des électrons de la NO synthase vers la L-Arginine^{175,177}. La BH₄ agit principalement au niveau de l'endothélium et plus de 60% de la BH₄ retrouvée dans les artères se situe au niveau de l'endothélium¹⁷⁸. La biosynthèse de BH₄ implique soit la voie *de novo* dans laquelle la GTP cyclohydrolase I est l'enzyme limitante¹⁷⁹, ou bien la voie de secours qui utilise l'enzyme dihydrolate réductase, avec la sepiaptérine comme étape intermédiaire¹⁸⁰. L'inhibition de la biosynthèse de BH₄ par l'inhibiteur de la GTP cyclohydrolase, le 2,4,-diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP), entraîne une vasorelaxation causée par le peroxyde d'hydrogène¹⁸¹ et pourrait compenser la diminution de production de NO en l'absence de BH₄¹⁸². Le métabolisme de la BH₄ est peu connu et son catabolisme semble très rapide *in vivo*. Les artères basilaires canines incubées avec le DAHP perdent plus de 95% de la BH₄ intracellulaire¹⁸³. Des études récentes suggèrent également que les niveaux intracellulaires de BH₄ sont réduits après l'ischémie-reperfusion¹⁸⁴.

La BH₄ sert de composé réducteur actif sur la NO synthase en fournissant les électrons nécessaires à l'oxygène. Durant la synthèse de NO, l'activation par l'oxygène de la portion hème de la NO synthase implique un transfert séquentiel de 2 électrons à la portion hème pour former l'hème-oxo et l'hème-peroxy, lesquels sont responsables de catalyser l'hydroxylation de la L-Arginine¹⁸⁵. La BH₄ est une source cinétiquement privilégiée d'électrons. **Des niveaux abaissés de BH₄ nuisent à la production de NO et provoque un changement de conformation de la NO synthase et un défaut de couplage de la NO synthase avec la BH₄¹⁸⁶, lequel pourrait être impliqué dans la dysfonction endothéliale secondaire à la CEC.**

En situation de déplétion de BH₄, les hème-oxy et hème-peroxy deviennent instables et entraînent la relâche d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène¹⁶⁵,

deux radicaux libres ayant des effets cytotoxiques direct sur l'endothélium¹⁶⁶. Des trois isoformes de la NO synthase, la NO synthase constitutive dérivée de l'endothélium (eNOS) est la plus fortement couplée à la BH₄¹⁸⁷, ce qui suggère que les formes neuronales (nNOS) et inducibles (iNOS) de la NO synthase sont potentiellement des sources plus importantes de radicaux libres. La BH₄ protège la NO synthase de la rétroaction négative du NO sur celle-ci¹⁸⁸. Les mécanismes antioxydatifs proposés de la BH₄ sont (1) couplage/activation de la NO synthase pour permettre la production de NO au lieu de radicaux libres¹⁸⁹; (2) l'inhibition directe dose-dépendante de la production d'anions superoxyde par l'oxydase hypoxanthine/xanthine^{177,190}; et (3) effet de vidange des radicaux libres par effet de réduction directe par la BH₄¹⁹¹.

La tétrahydrobioptérine (BH₄) est seulement active dans sa forme réduite et s'autoxyde en présence de hautes concentrations de radicaux libres, la rendant fonctionnellement inefficace comme antioxydant^{192,193}. Ainsi, malgré des concentrations possiblement adéquates de BH₄, ses rôles en tant qu'antioxydant et catalyseur de la formation de NO deviennent limités. Normalement, il y a un équilibre entre la production de NO et celle des radicaux libres de l'oxygène. Cet équilibre est maintenu en partie par l'action de la BH₄. Il a été proposé que la BH₄ pourrait être impliquée dans certains processus pathologiques tels l'athérosclérose¹⁹⁴ (Figure 15).

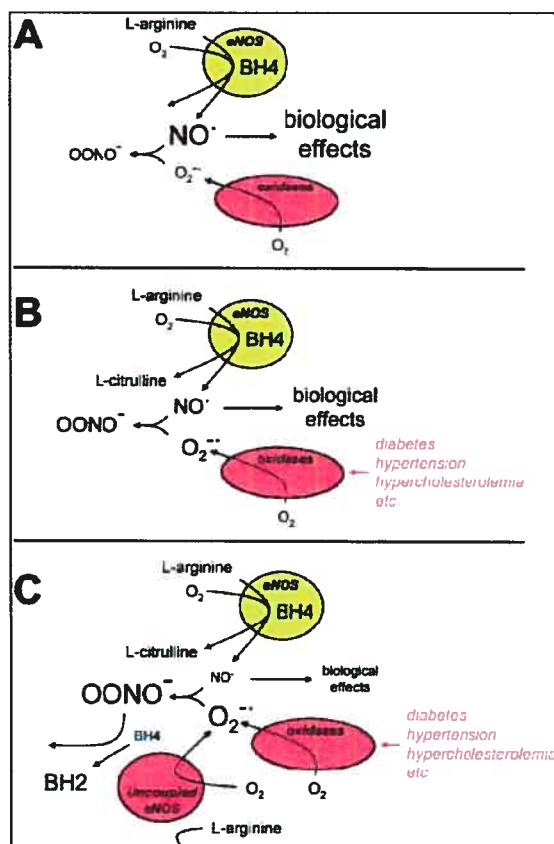


Figure 15. Régulation de l'activité de la synthase endothéliale du monoxyde d'azote par la tétrahydrobioptérine dans la maladie vasculaire. **A :** Au niveau de l'endothélium sain, la disponibilité de la tétrahydrobioptérine (BH₄) n'est pas limitée. La production de monoxyde d'azote (NO) par la synthase endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS) est appropriée pour permettre la régulation de multiples réactions biologiques anti-athérogéniques. La production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et de peroxynitrites ($ONOO^-$) est minimale. **B :** Dans les états de maladie vasculaire causés par le diabète, l'hypertension artérielle ou l'hypercholestérolémie, la production d' $O_2^{\cdot -}$ par les oxydases est grandement augmentée. La production de NO n'est initialement pas affectée, mais sa biodisponibilité est réduite puisqu'il est chélaté par l' $O_2^{\cdot -}$, ce qui favorise une production accrue de $ONOO^-$. **C:** Les $ONOO^-$ et autres radicaux libres dérivés de l'oxygène oxydent la BH₄ en BH₂ et bioptérine, ce qui entraîne une diminution de la biodisponibilité de la BH₄ et favorise un défaut de couplage de la BH₄. La eNOS produit alors l' $O_2^{\cdot -}$ au lieu du NO ce qui contribue au stress oxydatif vasculaire et réduit encore plus la biodisponibilité du NO. (Tiré de : Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1-9.)

On sait que les cytokines proinflammatoires induisent la production de BH₄ en stimulant la synthèse et l'activité enzymatique de la GTP cyclohydrolase, l'enzyme limitante de la biosynthèse de BH₄ au niveau des cellules endothéliales vasculaires^{195,196}. À des concentrations trop élevées, la BH₄ endogène libre (non liée au NO) s'autoxyde et induit un stress oxydatif en favorisant la production de radicaux libres tels l'anion superoxyde¹⁹⁷. Cette autooxydation de la BH₄ est inhibée par la superoxyde dismutase (Cu,Zn-SOD). La nécessité de concentrations optimales de BH₄ est donc très importante *in vivo*.

L'administration de BH₄ de par ses effets antioxydants et de production/stabilisation du NO, améliore la vasomotricité dépendante de l'endothélium dans plusieurs états pathologiques incluant la maladie coronarienne^{198,199,200}, l'hypertension artérielle²⁰¹, l'hypercholestérolémie^{202,203}, le diabète^{204,205} et le tabagisme²⁰⁶, l'ischémie-reperfusion des artères coronaires^{184,207,208} et après transplantation pulmonaire²⁰⁹, l'hypertrophie ventriculaire gauche²¹⁰ et la dysfonction endothéliale induite par les agents immunosuppresseurs dont la cyclosporine²¹¹. Les effets bénéfiques de l'administration exogène de BH₄ suggèrent fortement que des concentrations insuffisantes de BH₄ endogène sont associées à ces états pathologiques. Les effets bénéfiques de la BH₄ sont démontrés chez le porc^{199,209}, le chien^{178,181}, le rat^{201,204,207,212} et l'humain^{198,199,200,203,205,207}; et ce dans plusieurs lits vasculaires dont les artères coronaires épicaudiques^{184,198,203} et endocardiques (microvascularisation)¹⁹⁹, l'aorte²⁰⁴, les artères brachiales^{202,205}, cérébrales¹⁷⁸, rénales²¹² et pulmonaires²⁰⁹. Les effets de la BH₄ sur la dysfonction endothéliale coronarienne suite à la circulation extracorporelle n'ont pas été étudié.

Autres antioxydants

SOD/Catalase. La superoxyde dismutase (SOD) et la catalase sont des chélateurs de radicaux libres. Leurs effets ont été étudiés et comparés à ceux de la BH₄ dans un modèle d'ischémie-reperfusion²⁰⁷. Le complexe SOD/Catalase permet de chélater les radicaux libres durant les périodes d'ischémie et de reperfusion et de diminuer les dommages myocardiques secondaire à l'ischémie-reperfusion. Le complexe SOD/Catalase permettrait de diminuer le catabolisme du NO par les radicaux libres, dont l'anion superoxyde, mais ne semble pas agir directement au niveau de la NO synthase pour améliorer son activité à l'instar de la BH₄.

L-Arginine. La L-Arginine est un substrat essentiel pour la synthèse du NO. La combinaison de la L-Arginine et de la BH₄ pourrait avoir un effet synergique²¹³.

Acide ascorbique. La vitamine C ou acide ascorbique est un antioxydant aussi puissant que la BH₄ sur une base moléculaire. Des études *in vitro* ont suggéré que l'acide ascorbique exerçait ses effets par une augmentation des concentrations et une stabilisation chimique de la BH₄, stimulant ainsi la synthèse de NO^{214,215}. Cette protection de la BH₄ par l'acide ascorbique n'a toutefois pas été démontrée *in vivo*. Par exemple, l'aide ascorbique ne permet pas d'améliorer les lésions mécaniques et métaboliques induites par l'ischémie-reperfusion comparé à la BH₄²⁰⁷.

DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE DES ARTÈRES CORONAIRES SUIVANT LA CIRCULATION EXTRACORPORELLE

Des expériences récentes dans notre laboratoire ont documenté et caractérisé la survenue d'une dysfonction endothéliale au niveau des artères coronaires¹² et des artères pulmonaires²¹⁶ suite à l'utilisation de la circulation extracorporelle.

Au niveau des coronaires, la contraction d'anneaux artériels suite à l'exposition au chlorure de potassium (KCl) est de moindre amplitude suite à une CEC. Les doses de prostaglandine $F_{2\alpha}$ (vasoconstricteur indépendant de l'endothélium) pour obtenir une contraction sont plus élevées pour un anneau exposé à une CEC que pour un anneau contrôle, probablement suite à une expression augmentée d'iNOS qui, en produisant de hautes quantités de NO, diminue la sensibilité aux agents vasoconstricteurs. On remarque aussi que les relaxations dépendantes de l'endothélium suite à une stimulation par l'acétylcholine (ACh), dont les récepteurs sont couplés aux protéines-Gi (sensible à la toxine de la coqueluche) sont altérées de façon marquée. Cette diminution de sensibilité s'explique possiblement par un découplage fonctionnel entre le récepteur et la voie effectrice (protéines-Gi). De plus, les relaxations dépendantes de l'endothélium qui suivent la stimulation par bradykinine (BK) couplée aux protéines-Gq (insensibles à la toxine de la coqueluche) sont diminuées de façon moins importante suite à la CEC. Le découplage entre le récepteur et les protéines-G serait donc sélectif à la voie de production du NO couplée aux protéines-Gi. Cette atteinte sélective de la voie des protéines-Gi est comparable à celles observées dans des modèles d'ischémie-reperfusion^{225,226}, d'endothélium régénéré, d'hypercholestérolémie et d'athérosclérose chronique²²⁷, de rejet après transplantation cardiaque^{228,229} et de la dysfonction endothéliale induite par les immunosupresseurs²³⁰.

Chez le porc, le blocage de la synthèse du NO par le L-NMMA, un inhibiteur spécifique, n'inhibe pas totalement la relaxation dépendante de l'endothélium lors de la stimulation à la bradykinine. De plus, l'AMPc (impliquée dans la voie de la

prostacycline) est exprimée de façon plus marquée chez les porcs ayant subi une CEC. Ces deux constatations appuient la théorie de la compensation par d'autres facteurs vasorelaxants dépendants de l'endothélium, notamment la prostacycline et l'EDHF, lors d'une atteinte de la voie du NO. Finalement, la concentration de GMPc est diminuée dans la paroi des artères coronaires des porcs soumis à la CEC en comparaison aux porcs qui n'ont pas subi de chirurgie avec CEC, ce qui concorde aussi avec une diminution de la production de NO par l'endothélium suite à la CEC. Les étiologies suspectées de cette chute en GMPc, effecteur terminal de la voie du NO, sont une hausse de radicaux libres suivant la CEC et/ou une diminution de la production de NO. L'exposition à une CEC de 90 minutes suivie de 60 minutes de reperfusion entraîne donc une altération fonctionnelle des artères coronaires, mais l'intégrité morphologique de l'endothélium est conservée telle que démontrée par coloration au nitrate d'argent.

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES ET BUTS

La CEC est impliquée dans le syndrome de réponse inflammatoire systémique suivant la chirurgie cardiaque. La CEC active le système de contact, les voies du complément, les leucocytes, plaquettes et cellules endothéliales entraînant la relâche de multiples cytokines, protéases, leucotriènes, métabolites de l'acide arachidonique et radicaux libres de l'oxygène. Dans un modèle porcin de CEC, nous avons démontré que (1) la fonction endothéliale des artères pulmonaires²¹⁶ et des coronaires épicaudiques¹² est perturbée suivant la CEC ; (2) celle-ci est associée à une diminution du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), lesquels sont impliqués dans les voies de transduction des agents relaxants de l'endothélium (NO, PGI, EDHF) au niveau des lits vasculaires pulmonaire et coronaire; et (3) la CEC augmente le stress oxydatif et altère par le fait même la biodisponibilité du NO. Au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires et coronaires soumises à la CEC, les relaxations médiées par les récepteurs couplés aux protéines-Gi semblent touchées plus précocement et plus sévèrement que la voie médiée par les protéines-Gq. La tétrahydrobioptérine (BH4) est un cofacteur essentiel de la biosynthèse du NO et pourrait expliquer ce phénomène de dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques suite à la CEC.

Nous avons donc émis comme hypothèse que la CEC induit un état de déplétion et de diminution d'activité de la BH₄ endogène, laquelle serait responsable du défaut de couplage de la synthase du NO, de la dysfonction endothéliale des artères coronaires épicaudiques et de la production de radicaux libres. L'objectif de ce projet était de vérifier si l'administration *in vitro* de BH₄ améliore la relaxation endothélium-dépendante des artères coronaires post-CEC chez le porc (Figure 16).

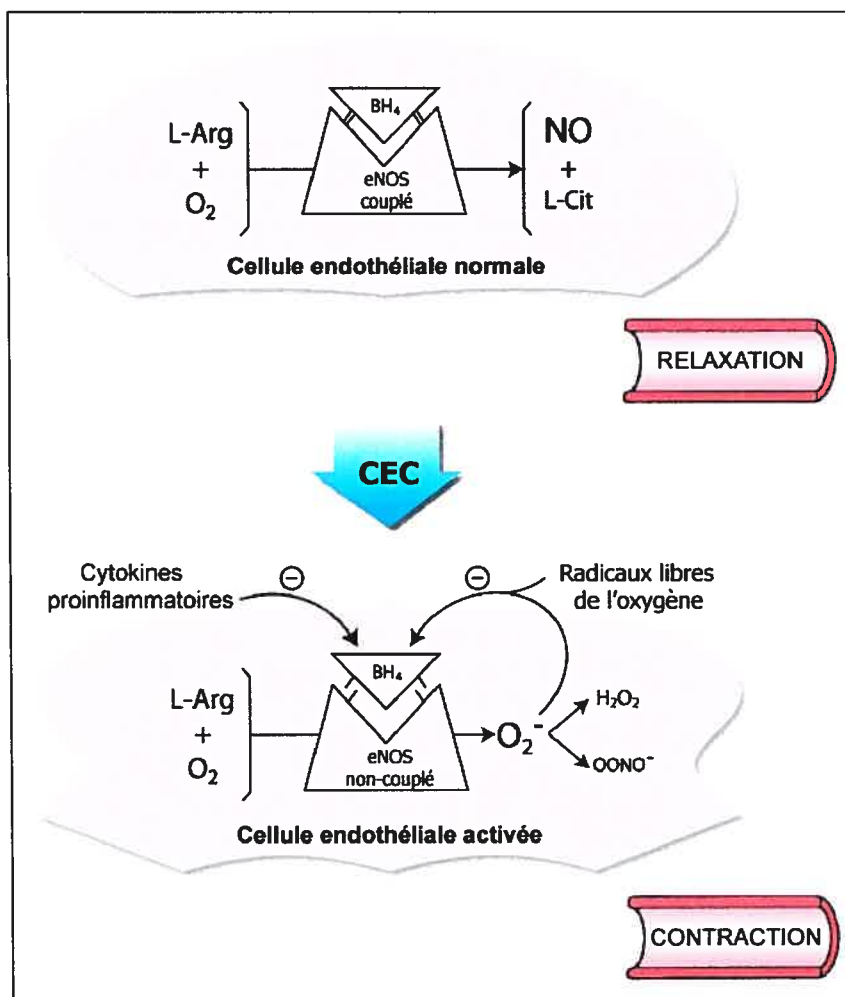


Figure 16 : Défaut de couplage de la synthèse endothéliale du monoxyde d'azote causé par une déplétion de la tétrahydrobioptérine et une augmentation du stress oxydatif suite à la circulation extracorporelle et ses effets sur la vasomotricité. (-) : inhibe; BH_4 : tétrahydrobioptérine; CEC : circulation extracorporelle; eNOS : synthase endothéliale du monoxyde d'azote; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène; L-Arg : L-Arginine; L-Cit : L-Citrulline ; NO : monoxyde d'azote; O_2 : oxygène ; $OONO^{\cdot -}$: peroxynitrites.

CHAPITRE III

CORPS DE LA THÈSE

ARTICLE ORIGINAL

Effect of tetrahydrobiopterin for coronary endothelial dysfunction induced by cardiopulmonary bypass

L.M. Stevens, MD^a

I. El-Hamamsy, MD^a

M. Carrier, MD^{a,b}

L.P. Perrault, MD, PhD^{a,b,c}

Word count (text): 4304

From the Research Center and Departments of Surgery^a, Montreal Heart Institute, Department of Surgery,^b and Pharmacology,^c Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Address for reprints: L.P. Perrault, MD, PhD, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330; Fax: (514) 376-1355 [REDACTED]

ABSTRACT

Background: The endothelial function of epicardial coronary arteries is impaired following exposure to cardiopulmonary bypass (CPB) and is associated with a decrease in cyclic guanosine monophosphate (cGMP) release and increased oxydative stress. Tetrahydrobiopterin (BH₄) is a potent antioxydant and an essential cofactor of nitric oxyde biosynthesis. We hypothesize that CPB induce a state of depletion and decreased activity of the endogenous BH₄ responsible for the NO synthase uncoupling and the coronary arteries endothelial dysfunction. The objective of this study was to assess if the *in vitro* administration of BH₄ improves the endothelium-dependent relaxation of coronary arteries in a swine model of CPB.

Methods: Swine underwent 90 min of CPB followed by a 60 min period after CPB weaning. After contraction with prostaglandin F_{2α}, endothelium-dependent relaxations of epicardial coronary artery rings to serotonin – which binds to 5HT_{1D} receptors coupled to Gi-proteins – and bradykinin (B₂ receptors coupled to Gq-proteins) were studied in the presence or absence of BH₄ using standard organ chamber experiments.

Results: CPB caused a statistically significant reduction of endothelium-dependent relaxations to serotonin (E_{max} [5HT]: 53% ± 4% vs 28% ± 4% for control, $p < 0.001$) and bradykinin in coronary arteries. BH₄ supplementation improved the endothelium-dependent relaxations to serotonin and bradykinin. Endothelium-independent relaxations to sodium nitroprussiate were unaltered.

Conclusion: *In vitro* treatment with BH₄ improves the endothelial dysfunction in porcine epicardial coronary arteries associated with CPB. BH₄ could play an important role in preventing and treating the systemic endothelial dysfunction resulting from CPB.

Word count: 244

Keywords: Antioxydants; Cardiopulmonary bypass; Coronary artery; Endothelial dysfunction; Surgery; Tetrahydrobiopterin

Cardiopulmonary bypass (CPB) contributes to the systemic inflammatory response following cardiac surgery. CPB activates the contact system, complement pathway, coagulation/fibrinolysis systems, leukocytes, platelets and endothelial cells to stimulate release of multiple cytokines, proteases, leukotrienes, arachidonic acid metabolites and oxygen free radicals. Recent research from our group has shown that the endothelial function of swine pulmonary arteries²¹⁶ and epicardial coronary arteries¹² are impaired following cardiopulmonary bypass and are associated with a decrease in cyclic guanosine monophosphate (cGMP) release, increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and increased oxidative stress. These results suggest impairment in nitric oxide (NO) bioavailability and/or activity.

The normal vascular endothelium is a selective non-thrombogenic barrier actively involved in the cardiovascular homeostasis by virtue of its roles in membrane permeability, lipid transport, vascular tone, regulation of neutrophil and platelet adhesion, vascular smooth muscle cells and fibrocytes proliferation, coagulation and fibrinolysis. Normal endothelial vasomotion results from an equilibrium between endothelium-dependent relaxing factors, such as NO, prostacyclin and the endothelium-dependent hyperpolarizing factor (EDHF), and endothelium-dependent contracting factors, such as superoxide anions, endoperoxides, thromboxane A₂ and endothelin. Owing to its unique position at the blood-organ interface, the endothelium is the primary target for secondary lesions due to hypertension, atherosclerosis, diabetes, ischemia-reperfusion, and cardiopulmonary bypass.

NO biosynthesis from L-Arginine by NO synthase requires several cofactors including NADPH, Ca²⁺/calmodulin, flavin nucleotides and tetrahydrobiopterin (BH₄)²¹⁷. Tetrahydrobiopterin (BH₄) is an essential cofactor of nitric oxide biosynthesis. Diminished levels of BH₄ lead to an uncoupling of NO synthase (NOS), with a shift towards production of peroxynitrites (OONO⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂)^{165,218}, two oxygen free radicals with direct cytotoxic effects on the endothelium¹⁶⁶. BH₄ is modulated by the redox state of cells, which is influenced by free radicals and associated oxidant injury. BH₄ supplementation promotes NO

production and others antioxydant effects known to improve endothelium-dependent vasomotion in a number of pathological states including coronary artery disease^{198,200}, hypercholesterolemia²⁰³, ischemia-reperfusion^{182,208} and diabetes²⁰⁵. Since the endothelial dysfunction following CPB is associated with an impairment of NO expression and/or activity and an increased state of oxydative stress, we tested the hypothesis that (1) endogenous BH₄ is decreased during CPB leading to an uncoupling of NOS and perpetuated oxydative stress, and (2) *in vitro* BH₄ administration improves the endothelial dysfunction of coronary arteries secondary to CPB.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were performed using Landrace swine (McGill University, Montreal, Canada) of either gender weighing 27 ± 3 kg. Animals were maintained and tested in accordance with the recommendations of the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Research and the guidelines of the Animal Care, and the research protocol was approved by a local ethics committee.

Anaesthesia was induced with an intramuscular injection mixture of ketamine hydrochloride (katalean® 20 mg/kg; Bimeda MTC, Cambridge, ON, Canada) and xylazine (rompun® 4 mg/kg; Bayer inc., Toronto, ON, Canada). Swine were mechanically ventilated with an O₂/air mixture (5:3) at 18 breaths/minutes and a tidal volume of 10 ml/kg. Anaesthesia was maintained with 1% isoflurane inhalation (Abbott Laboratories Limited, Saint-Laurent, QC, Canada). Arterial and mixed venous blood gases were obtained at regular intervals during the experiment and maintained within physiological limits by adjusting the inspired oxygen fraction (FiO₂), ventilation rate and tidal volume. The electrocardiogram was recorded from five subcutaneous precordial and limb electrodes. Blood oxygen saturation and heart

rate were also recorded by pulse oxymetry (Oxismart XL, Nellcor Puritan Bennett Inc., Pleasanton, CA).

Experimental Groups

Group 1: Control. After skin preparation, the heart was exposed via a median sternotomy. Heparin 300 UI/kg (Leo Pharma, Inc., Ajax, ON) was given intravenously. After 1 hour of general anaesthesia with 1% isoflurane, the animal was exsanguinated and the heart harvested.

Group 2: Cardiopulmonary bypass with or without *in vitro* tetrahydrobiopterin. After skin preparation and draping with sterile fields, the internal carotid artery and both jugular vein were cannulated (Avanti®+ introducer, Cordis corporation, Miami, Fla). A cystostomy was performed for urine output measurement. A median sternotomy was performed and the pericardium opened for exposure of the heart.

After heparin administration (300 UI/kg; Organon teknika, Toronto, ON, Canada), a double purse string was placed on the proximal ascending aorta and a single purse string on the right atrium. A blood sample was drawn and proper anticoagulation assessed with an activated coagulation time (ACT) (Hemochron 401, Technidyne, Edison, NJ). When the ACT was superior to 400 seconds, the aorta and right atrium were cannulated respectively with a 20-Fr and a 29-Fr cannulas (Medtronic DLP cannula, Minneapolis, MN), and the CPB was initiated thereafter. The CPB circuit consisted of a hollow fiber membrane oxygenator with incorporated filtered hardshell venous reservoir (Monolyth, Sorin, Irvine, CA), a heater-cooler and a roller pump (Sarns 7000, Ann Harbor, MI). The circuit was primed with pentaspan 500 ml (10% Pentastarch; DuPont Pharma Inc, Mississauga, ON, Canada), lactated Ringer's 350 ml, heparin 5000 UI, mannitol 6.25 g and sodium bicarbonate 15 mEq. After stabilization on CPB, ventilation was stopped. Anaesthesia was maintained

with a continuous infusion of propofol (50-150 µg/kg/min; Abbott Laboratories limited, Saint-Laurent, QC, Canada).

After initial stabilization, the pump flow was adjusted to obtain a cardiac index of more than 2.4 L/min/m² and assessed by arterial and venous gases to maintain a mixed venous saturation above 60%. The mean arterial pressure was maintained between 45 and 65 mmHg with crystalloid (lactated Ringer's). No vasopressor drugs or sodium bicarbonate were used during the experiment. The temperature was allowed to drift to 36°C. The heart was left beating, empty. No aortic cross-clamping or cardioplegia was used. Before CPB weaning, swine were rewarmed to 38°C. After 90 minutes of CPB, mechanical ventilation and isoflurane anaesthesia were reinstituted and CPB was weaned. No protamine was given due to its cardiovascular effects such as complement activation²¹⁹ and NO production²²⁰. Normal circulation was restored for 60 minutes, at which time the animal was exsanguinated. The beating heart was excised and immediately immersed in a modified Krebs-bicarbonate solution at 4°C (composition in mmol/L: NaCl 118.3, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11.1, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25 and ethylenediaminetetraacetic acid 0.026).

Hemodynamic data

The carotid catheter was used to measure the mean systemic blood pressure (MAP). After jugular cannulation and median sternotomy, a 7.5 F four-lumen Swan Ganz thermodilution catheter (Edwards Lifesciences LLC, Irvine, CA) was guided in the pulmonary artery. Hemodynamic data and arteriovenous gases were obtained at six predefined times during the experiment: preoperatively (before placement of the purse string), during CPB at 15, 45 and 75 min, and postoperatively at 30 and 60 min. All pressure values were obtained using calibrated and balanced transducers zeroed at the mid-chest level and recorded using a multichannel recorder (Solar 8000, GE Marquette Medical Systems Inc., Milwaukee, WI). The thermodilution

catheter was used to measure cardiac output (CO), mean pulmonary artery pressure (MPAP), pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) and central venous pressure (CVP), obtained both before and after CPB when the normal circulation was restored.

Cardiac output was calculated as the area under the thermodilution curve. During CPB, the CPB systemic blood flow was used to estimate the CO considering that the heart contributes minimally to the systemic blood flow during CPB with adequate venous decompression and a competent aortic valve. Cardiac index (CI) was derived as the CO divided by the body surface area (BSA), where $BSA = 0.0974 \times \text{Weight}(kg)^{0.633}$ according to Brody's swine body surface area equation²²¹. Pulmonary vascular resistance index (PVRI) and systemic vascular resistance index (SVRI) were calculated using the following relationship: $PVRI = (MPAP - PCWP) \times 79.92 / CI$ and $SVRI = (MAP - CVP) \times 79.92 / CI$, where 79.92 is a constant for converting to absolute units and are expressed in $\text{dynes} \cdot \text{sec} \cdot \text{m}^2 / \text{cm}^5$. Left ventricular stroke work index (LVSWI) was calculated as follow: $LVSWI = (MAP - PCWP) \times SVI \times 13.6$, where 13.6 is a constant for converting pressure and volume to units of work and is expressed in $\text{mg} \cdot \text{m} / \text{m}^2$. Oxygen extraction ratio (O_2ER) was calculated as the ratio of oxygen uptake (VO_2) to oxygen delivery (DO_2), where $VO_2 = CI \times 13.4 \times Hb \times (SaO_2 - SvO_2)$ and $DO_2 = CI \times 13.4 \times Hb \times SaO_2$. Haemoglobin in g/L (Hb), lactatemia, arterial oxygen saturation (SaO_2) and mixed venous oxygen saturation (SvO_2) were obtained from simultaneous blood gases taken directly from the aorta and right atria, respectively.

Vascular reactivity studies

Less than 10 minutes after heart excision, epicardial coronary arteries were dissected free of the surrounding myocardium and epicardial fat, and were divided into rings 4 mm in length. A total of 16 coronary arterial rings were harvested.

Rings from the left anterior descending and circumflex coronary arteries were used randomly. The vascular reactivity was studied in organ chambers filled with modified Krebs-bicarbonate solution at 37°C with 95% O₂ and 5% CO₂. The rings were suspended between two metal stirrups, one being connected to an isometric force transducer. Data were collected with data acquisition software (IOX 1.203; Emka Inc, Paris, France).

Each arterial rings was stretched to the optimal point of its active length-tension curve (usually 4 g) as determined by measuring the contraction to potassium chloride (KCl, 30 mol/L) at different levels of stretch. The maximal contraction of rings was obtained with addition of KCl (60 mmol/L) and the baths were washed twice with modified Krebs-bicarbonate solution. The studies were performed in the presence of ketanserin (10⁻⁶ mol/L, incubated 40 minutes before the addition of serotonin to competitively block serotonin 5HT₂ receptors), indomethacin (10⁻⁵ mol/L, to exclude the production of endogenous prostanoids) and propranolol (10⁻⁷ mol/L, to prevent the activation of β -adrenergic receptors). After 45 minutes of stabilization, prostaglandin F_{2 α} (range 2 x 10⁻⁶ to 3 x 10⁻⁵ mol/L) was added to obtain a contraction averaging 50% of the maximal contraction to KCl (60 mmol/L). In paired experiments, half of the preparations were incubated with tetrahydrobiopterin (150 U/mL) 45 minutes before exposure to PGF_{2 α} .

The NO-mediated relaxation pathway was studied by constructing concentration-response curves to serotonin (5-hydroxytryptamine (5HT) creatinine sulfate, 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵ mol/L; an agonist coupled to Gi-proteins that binds to 5HT_{1D} receptors), and to bradykinin (BK) (10⁻¹² to 10⁻⁶ mol/L; an agonist coupled to Gq-proteins receptors leading to the release of NO and the endothelium-derived hyperpolarizing factor). At the completion of serotonin testing, the rings were left to recontract until a plateau was reached, then BK testing was initiated for each ring.

At the end of the experiment, endothelium-independent relaxations were studied with sodium nitroprusside (SNP, 10⁻⁵ mol/L, a nitric oxide donor) to study the integrity of vascular smooth muscle cells.

Drugs

All solutions were prepared daily. Indomethacin, ketanserin, 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate (serotonin), bradykinin and sodium nitroprusside were purchased from Sigma Chemical Co. (ON, Canada). Propranolol was purchased from Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, PA) and prostaglandin $F_{2\alpha}$ was obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm standard error to the mean (SEM). Repeated measures ANOVA studies were performed to compare hemodynamic and biochemical data. The Newman-Keuls test was used as the post-hoc test. Contractions to prostaglandin $F_{2\alpha}$ are expressed as a percentage of the maximal contraction to KCl (60 mM). Relaxations to serotonin are expressed as the percentage of the maximal contraction to prostaglandin $F_{2\alpha}$. Relaxations to bradykinin are expressed as the percentage of the maximal contraction to serotonin. For each rings; "n" refers to the number of animals from which blood vessels were taken. ANOVA studies were performed to compare concentration-response curves. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using SAS (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Hemodynamic Data

During CPB, there was a significant decrease in hematocrit ($p < 0.001$) and an increase in lactatemia and glycemia ($p = 0.006$ and $p < 0.001$, respectively). After CPB, MAP and SVRI decreased significantly ($p = 0.04$ and $p = 0.002$, respectively) and CI increased, although non significantly. Following CPB, there was a significant increase in the arteriovenous oxygen saturation gradient and oxygen extraction ratio ($p = 0.007$ and $p = 0.005$). During the experiment, no significant difference in HR, MPAP, CVP, PCWP, PVRI and LVSWI were observed. There was no significant difference either in base excess, pH, $p\text{CO}_2$ and $p\text{O}_2$ gradients.

Vascular Reactivity Studies

Contraction

There was no difference in the amplitude of the contraction to potassium chloride (60 mmol/L) between the groups (Table I). The amplitude of contraction to $\text{PGF}_{2\alpha}$ was significantly higher in the control group ($p = 0.03$), but there was no difference in the concentration of $\text{PGF}_{2\alpha}$ needed to achieve the target level of contraction.

Relaxations

Endothelium-Dependent Relaxations: NO pathway.

There was a statistically significant decrease in endothelium-dependent relaxation to serotonin in coronary rings following CPB compared with controls (E_{\max} [5HT]: $53\% \pm 4\%$ vs $28\% \pm 4\%$ for control, $p < 0.001$) (Figure 1). BH_4

supplementation significantly improved the endothelium-dependent relaxations to serotonin following CPB (E_{\max} [5HT]: $45\% \pm 3\%$, $p = 0.03$) for the two highest concentrations of serotonin.

Endothelium-dependent relaxation to bradykinin was decreased ([BK]: 3×10^{-8} to 1×10^{-7}) in the CPB group compared with control ($p < 0.05$) (Figure 2). No difference in the maximal relaxation to bradykinin was observed between groups, but the CPB group reached maximal relaxation at a higher bradykinin concentration compared with control ([BK]: 1×10^{-6} vs 1×10^{-7}). BH_4 supplementation improved the endothelium-dependent relaxation to bradykinin ([BK]: 1×10^{-8}) in the CPB group, with no significant difference between the CPB group with BH_4 and the control group.

Endothelium-Independent Relaxations

There was no statistically significant difference in the relaxation to SNP between groups with all rings achieving 100% relaxation (data not shown).

DISCUSSION

Earlier experiments in our laboratory suggested that CPB without cardioplegia or crossclamping in an adult swine model of CPB was associated with specific endothelium-dependent dysfunction of the NO pathway. The present study assessed more specifically the implication of BH_4 in the pathogenesis of that dysfunction. The major findings of the present study are the following: (1) endothelium-dependent contractions to $PGF_{2\alpha}$ were decreased after CPB, with or without BH_4 treatment; (2) endothelium-dependent relaxations to serotonin and bradykinin were significantly altered following CPB; (3) BH_4 treatment partially improved the endothelium-dependent relaxation to serotonin and to bradykinin.

Endothelial Dysfunction and Etiologic Hypothesis

The endothelium is a selective barrier responsible for maintaining a non-thrombogenic surface, ensures the metabolism of circulating substances such as norepinephrine and bradykinin, regulates smooth muscle proliferation and controls the vasomotor tone of vessels. the vascular endothelium contributes to the systemic inflammatory response syndrome to CPB along with five blood protein system (contact system, complement, intrinsic and extrinsic coagulation pathways, and fibrinolysis pathway) and four cells types (neutrophils, monocytes, lymphocytes and platelets). Cytokines, complement activation products, hypoxia, oxygen-derived free radicals, endothelins and other inflammatory signals, contribute to the systemic activation of the endothelium¹⁰⁹. Activated endothelial cells express surface proteins, such as E- and P-selectin, ICAM and VCAM, which promote platelet and neutrophil aggregation/activation, releasing proteases, oxygen-derived free radicals and promoting further endothelial cell activation and dysfunction. Ischemia-reperfusion by-products released in the circulation from the pulmonary vasculature and distal less perfused vascular beds contribute to the systemic activation of the endothelium. Endothelium control of the vasomotor tone is hence affected early in the SIRS following CPB.

The vasoregulatory function of the endothelium may be affected in numerous ways, including (1) the impairment of G-proteins and/or their respective receptors, (2) decreased release or production of vasodilators, such as NO, prostacyclin and/or EDHF, (3) increased destruction or scavenging of NO, (4) increased production of vasoconstrictors, including endoperoxydes, reactive oxygen species and/or endothelin-1, (5) resistance of the vascular smooth muscle to vasodilators and (6) increased sensitivity of the vascular smooth muscle to vasoconstrictors⁴⁰. The site of dysfunction responsible for the impaired endothelium-dependent relaxations can be located at various levels: receptor, G-proteins, intracellular signaling pathways (enzymes or ion channels) or vascular smooth muscle. The intracellular cascades following G-proteins activation are not easily evaluated. Ion channels and enzyme

characterizations require extensive experimentation and were not the subject of this study.

Temperature changes can influence endothelial derived relaxing factors (EDRF) release but are unlikely to be significant in this model. Hypothermia may impair the stimulated release of EDRF and inhibit its basal production⁵. Pulsatile flow stimulates the release of EDRF from perfused arterial segments²²². CPB generates a non-pulsatile flow in our model and basal cGMP levels are low following CPB. The precise role of acute flow changes in decreasing endothelium-dependent relaxations is unknown.

Contraction

Using similar $\text{PGF}_{2\alpha}$ doses, endothelium-dependent contractions to $\text{PGF}_{2\alpha}$ were significantly decreased after CPB, with or without BH_4 treatment, whereas endothelium-independent contractions to KCl were unaltered. CPB could cause an overexpression of the inducible form of NOS (iNOS) with increased production and secretion of endothelium-derived vasodilators such as NO, prostacyclin and/or EDHF counteracting the vasoconstrictor effect of $\text{PGF}_{2\alpha}$. These findings also suggest that the integrity of the vascular smooth muscle was maintained since KCl directly stimulates the smooth muscle.

Relaxation

The NO pathway was studied using well characterized G-proteins mediated endothelium-dependent relaxations. Serotonin binds to $5\text{HT}_{1\text{D}}$ -serotonergic receptors coupled to pertussis toxin sensitive Gi -proteins. Ketanserin was used to prevent direct contraction of smooth muscle cells through 5HT_2 -serotonergic receptors. Impairment of Gi -proteins mediated relaxation was demonstrated by the

lower maximal relaxation obtained in the concentration-response curves to serotonin for the CPB group. In previous experiments using the same CPB protocol in the swine model, impairment of the Gi-proteins mediated pathway was shown by lower maximal relaxation to α_2 -adrenergic agonist UK_{14,304} also coupled to pertussis toxin sensitive Gi-proteins¹².

Bradykinin binds to B₂ receptors coupled to pertussis toxin insensitive Gq-proteins. The maximal relaxation was reached later in the CPB group compared to control which is consistent with our prior experience¹² and confirm the impairment of Gq-protein mediated relaxation. Cugno et al.²²³ reported an increase in plasma bradykinin of patients submitted to CPB culminating at the end of the procedure likely related to the reduced catabolism of bradykinin as a consequence of intrapulmonary shunt. An increase in bradykinin throughout the experiment could acutely down-regulate the concentration of B₂ receptors on the surface of endothelial cells, although this remains speculative since neither the bradykinin concentration nor the density of B₂ receptors were measured in that model. The increased concentration of bradykinin and increased shear stress secondary to nonphysiologic CPB perfusion could also promote production of oxygen-derived free radicals by endothelial cells²²⁴.

In this swine model of CPB, endothelium-dependent relaxations mediated by G-proteins were impaired although those mediated by Gq-proteins were altered to a lesser degree than those mediated by pertussis toxin sensitive Gi-proteins. This preferential involvement of the Gi-proteins mediated pathway is similar to that observed in CPB with cross-clamping (ischemia-reperfusion model) in the canine model^{225,226} and other porcine cardiovascular pathology models, such as regenerated endothelium, hypercholesterolemia, chronic atherosclerosis²²⁷, rejection after heart transplantation^{228,229} and immunosuppressor-induced endothelial dysfunction²³⁰ in which there is an early selective involvement of endothelium-dependent relaxations mediated by Gi-proteins with later alteration of the Gq-proteins mediated pathway as the endothelial dysfunction progresses. To our knowledge, only two studies briefly reported the endothelial function of coronary arteries with CPB alone, without cross-

clamping or cardioplegia^{225,226}. These experiments were performed using the canine model and the exact CPB duration was not specified (between 45 and 150 minutes). No significant impairment of endothelium-dependent relaxations to acetylcholine, serotonin, adenosine diphosphate (coupled with Gq-proteins), calcium ionophore A23187 (endothelium-dependent receptor-independent) or sodium fluoride (a direct activator of G-proteins) were demonstrated. One possible explanation for these differences could be the increased coronary collateralization present in the canine model and superior tolerance to global ischemia compared with the porcine model.

Global ischemia alone does not seem to be associated with a significant impairment of endothelium-dependent relaxations of coronary arteries^{231,232,233}. However, reperfusion with or without cardioplegia impairs vasorelaxation responses in coronary arteries. In a study by Nakanishi and colleagues²³¹ anatomical damages to the coronary artery wall were caused by reperfusion (not present with ischemia alone, and not prevented by blood cardioplegia), with intimal edema, death of endothelial cells and exposed areas of the subendothelium. Endothelium-independent relaxations to NO donors are consistently normal, confirming the integrity of the vascular smooth muscle. In our model, as no aortic cross-clamping was applied, there was no reperfusion *per se*, which leads us to conclude that CPB in itself induces functional damage to porcine coronary arteries.

Effects of Tetrahydrobiopterin

Nitric oxide can be synthesized either by constitutive or inducible nitric oxide synthase. Essential cofactors to NO synthases include NADPH, Ca^{2+} /calmodulin, flavin nucleotides and BH_4 ¹⁸¹. BH_4 helps to stabilize the dimeric active form of NO synthase by increasing its affinity to L-Arginine and is a kinetically privileged source of electrons for this reaction^{175,182}. BH_4 is produced through two different pathways, namely the “de novo pathway” in which the enzyme GTP cyclohydroxylase I is the rate limiting step¹⁷⁹, and the “salvage pathway” which

uses sepiapterin as an intermediate step¹⁸⁰. Inhibition of BH₄ synthesis with a GTP hydroxylase I inhibitor leads to endothelium-dependent relaxation. This is explained by the uncoupling of NO synthase with L-Arginine, with the resultant production of vasodilator hydrogen peroxide and other reactive oxygen species instead of NO^{165,218} (Figure 3). Antioxydative mechanisms of BH₄ are: (1) coupling/activation of NO synthase and inhibition of NO negative retroaction on NO synthase, (2) dose-dependent direct inhibition of superoxide anion production by hypoxanthine/xanthine oxydase¹⁷⁷, and (3) scavenging of free radicals by the direct redox effect of BH₄¹⁹¹.

BH₄ is only active in its reduced state and is autooxyded in the presence of high concentrations of oxygen free radicals, rendering endogenous BH₄ insufficient in marked oxydative states. Increased levels of oxygen free radicals may also alter the involvement of BH₄ in the oxydation process of NO synthesis from L-Arginine, affect BH₄ biosynthesis by depletion of NADPH, or prevent recycling of BH₄, which may occur through flavin nucleotides via NADPH as suggested by Scott-Burden¹⁸². Exogenous administration of BH₄ improves the endothelium-dependent vasoreactivity in many pathological states such as atherosclerotic coronary disease^{198,200}, arterial hypertension²⁰¹, hypercholesterolemia²⁰³, diabetes²⁰⁵, smoking²⁰⁶, coronary ischemia-reperfusion^{182,208} and left ventricular hypertrophy²¹⁰. The beneficial effects of exogenous administration of BH₄ suggest that endogenous BH₄ concentrations are insufficient in these pathological states. Benefits of BH₄ administration are demonstrated in the swine^{199,209,210}, canine^{178,181}, rat models^{201,204,207,212} and in humans^{198,199,200,203,205,207}; as well as in various vascular beds such as aorta²⁰⁴, epicardial^{184,198,203,210}, subendocardial (microvascularization)¹⁹⁹, brachial^{202,205}, cerebral¹⁷⁸, renal²¹² and pulmonary arteries²⁰⁹.

In this study, we tested the hypothesis that BH₄ endogenous concentration is decreased during CPB leading to an uncoupling of NOS and increased oxydative stress (Figure 4), and that *in vitro* supplementation of BH₄ improves the endothelium-dependent dysfunction of coronary arteries secondary to CPB. BH₄

administration partially restored the endothelium-dependent relaxations to serotonin mediated by Gi-proteins and Gq-proteins. This is shown by a significant improvement of maximal relaxations to serotonin and bradykinin. Incomplete reversal of the endothelial dysfunction could be explained by impairment at the level of receptor, Gi-proteins/Gq-proteins or smooth muscle cell which are not directly addressed by *in vitro* BH₄ supplementation. *In vivo* BH₄ administration before induction of cardiopulmonary bypass could possibly prevent the occurrence of the oxidative injury.

Limitations

The following limitations to this study need to be addressed. First, this is an acute animal study and although earlier experiments suggest a close relationship between porcine and human endothelial responses, these data should be interpreted with caution. Second, in order to assess more specifically the response to CPB, no cardioplegia, aortic cross-clamping or heparin reversal with protamine were used. Other experiments are needed to assess the impact of these interventions. Third, use of propofol during CPB could have provided some degree of protection against oxidative injury²³⁴ and reduced the extent of the endothelial dysfunction. Fourth, a sham group and a control group with BH₄ supplementation were not included in our protocol since our previous studies have shown no difference between concentration-response curves of the control and sham²¹⁶ or control with BH₄²¹⁰ groups in the same swine model. Finally, it is possible that *in vivo* BH₄ supplementation, in cardiopulmonary bypass priming solution or as an adjunct to cardioplegia, would be more beneficial than *in vitro* administration after the endothelial oxidative injury. However, BH₄ supplementation in the priming solution would necessitate high doses of BH₄ which could affect the hemodynamics during CPB. Administration of BH₄ in the cardioplegia solution could improve the ischemia-reperfusion associated with hyperkalemic cardiac arrest but was not the subject of this study in which the effect of CPB *per se* was evaluated without cardioplegia and cross-clamping.

Future directions

Others strategies to control the systemic inflammatory response syndrome associated with CPB have been studied, targeting multiple interrelated systems: contact system, complement, intrinsic and extrinsic coagulation cascades, fibrinolysis, leukocytes, platelets and endothelial cells. These strategies have included: corticosteroids²³⁵; anti-C5a monoclonal antibody²³⁶; inhibition of the transcriptional activator protein NFkB²³⁷; protease inhibitors such as Aprotinin²³⁸ or Nafamostat²³⁹; phosphodiesterase inhibitors²⁴⁰; anti-oxydants and NO agonists such as Allopurinol²⁴¹, L-Arginine²⁴² and BH₄; and endothelin-A receptor blockade²⁴³. Control of the whole body inflammatory response to CPB would probably necessitate a multimodal treatment approach considering the systems involved, all of which can affect the vascular endothelium.

CONCLUSION

In summary, swine CPB is associated with a selective dysfunction of coronary endothelium-dependent relaxations mediated by pertussis-toxin sensitive Gi-proteins, and to a lesser extent, to pertussis-toxin insensitive Gq-proteins. BH₄ administration improves the endothelium-dependent relaxations mediated by Gi-proteins and Gq-proteins. *In vivo* administration of BH₄ in the circuit priming or cardioplegia, may prove more beneficial during or after CPB weaning and recirculation of toxic metabolites and oxygen-derived free-radicals from underperfused vascular beds. Therefore, BH₄ could play an important role in preventing and treating the systemic endothelial dysfunction resulting from CPB and could be integrated with other promising treatment strategies. Intracoronary and intravenous routes of administration of BH₄ have been studied *in vivo* with few reported side-effects (hypotension, flushing), but need to be addressed in larger human prospective studies.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the *Fonds de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal* (FRICM), the Montreal Heart Institute Research Foundation and Department of Surgery of the *Université de Montréal*. Dr. Louis P. Perrault is a Research Scholar Junior 2 from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors would like to thank Mme Marie-Pierre Mathieu for her skilful technical assistance and Mme Annik Fortier for her statistical expertise.

TABLE I. Contraction to potassium chloride and prostaglandin F_{2α} of porcine coronary arteries after cardiopulmonary bypass

	Control (n=6)	CPB (n=6)	CPB with BH ₄ (n = 6)
KCl (60mM) (g)	11.5 ± 0.5	12.6 ± 1.1	11.7 ± 0.8
PGF _{2α} (g)	8.9 ± 0.5 [§]	7.8 ± 0.7	7.2 ± 0.5
PGF _{2α} concentrations (10 ⁻⁶ M)*	6.2 ± 0.3	6.0 ± 0.6	6.3 ± 0.5
Ratio PGF _{2α} / KCl	76% ± 2% [¶]	66% ± 4%	65% ± 3%

* For achieving 50% of > KCl contraction. [§] $p = 0.03$ control vs CPB and CPB+BH₄.

[¶] $p < 0.001$ control vs CPB and CPB+BH₄. CPB: cardiopulmonary bypass; KCl: potassium chloride; PGF_{2α} : prostaglandin F_{2α}.

Figure Legends

- Figure 1 Cumulative concentration-response curve to the endothelium-dependent vasodilator serotonin (5HT) in rings of porcine coronary arteries. Responses are given as a percentage of maximal contraction to PGF_{2α} (% E_{max}). Results are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.05$ CPB vs CPB + BH₄. CPB: cardiopulmonary bypass; BH₄: tetrahydrobiopterin.
- Figure 2 Cumulative concentration-response curve to the endothelium-dependent vasodilator bradykinin (BK) in rings of porcine coronary arteries. Responses are given as a percentage of maximal contraction to serotonin (5HT). Results are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$ vs control. CPB: cardiopulmonary bypass; BH₄: tetrahydrobiopterin.
- Figure 3 eNOS uncoupling caused by endogenous tetrahydrobiopterin (BH₄) depletion and increased oxydative stress following cardiopulmonary bypass and their effect on vasomotor tone.

FIGURE 1.

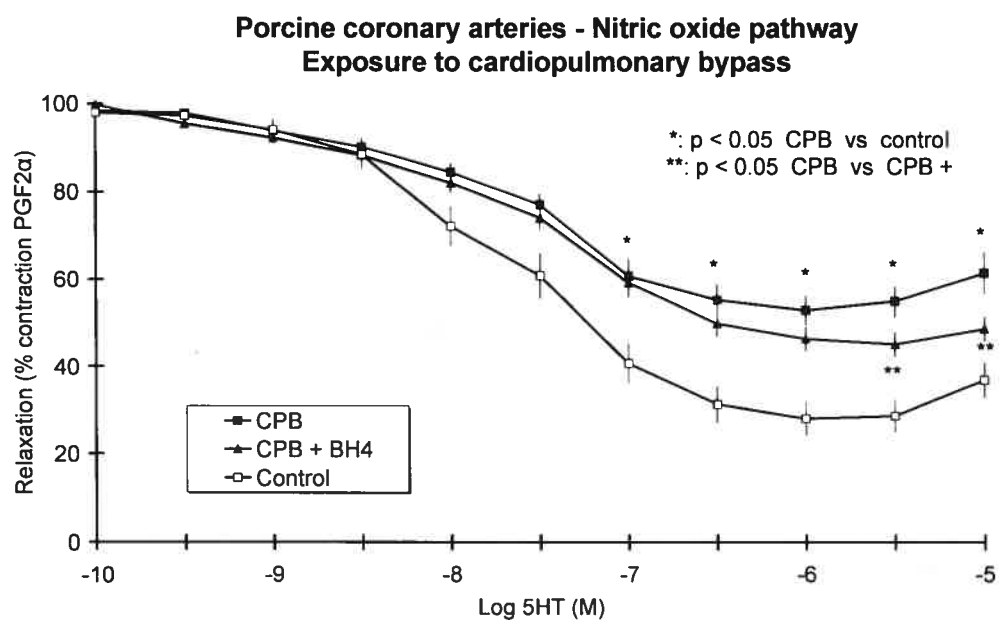


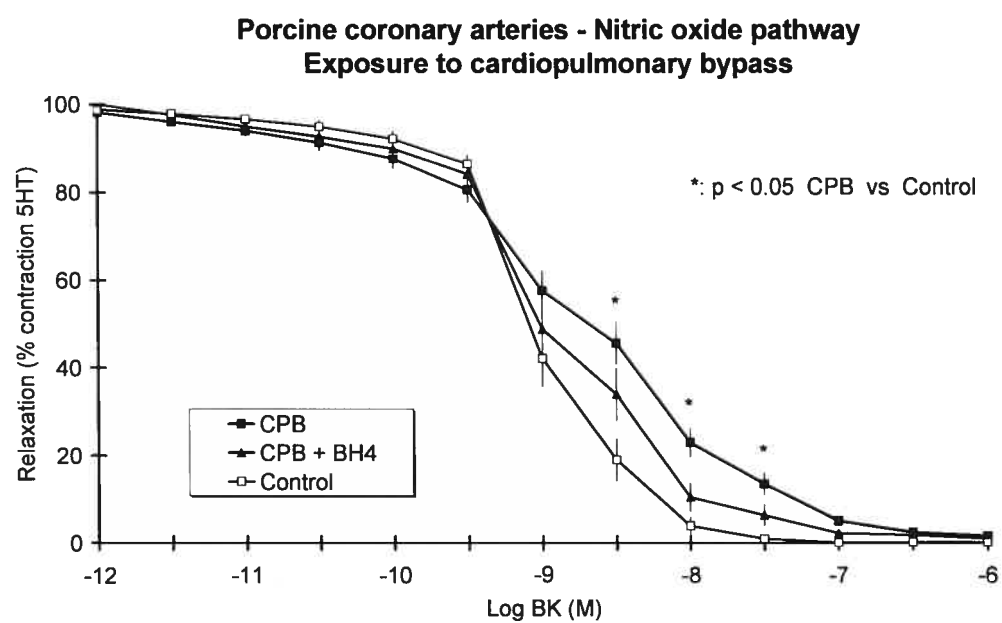
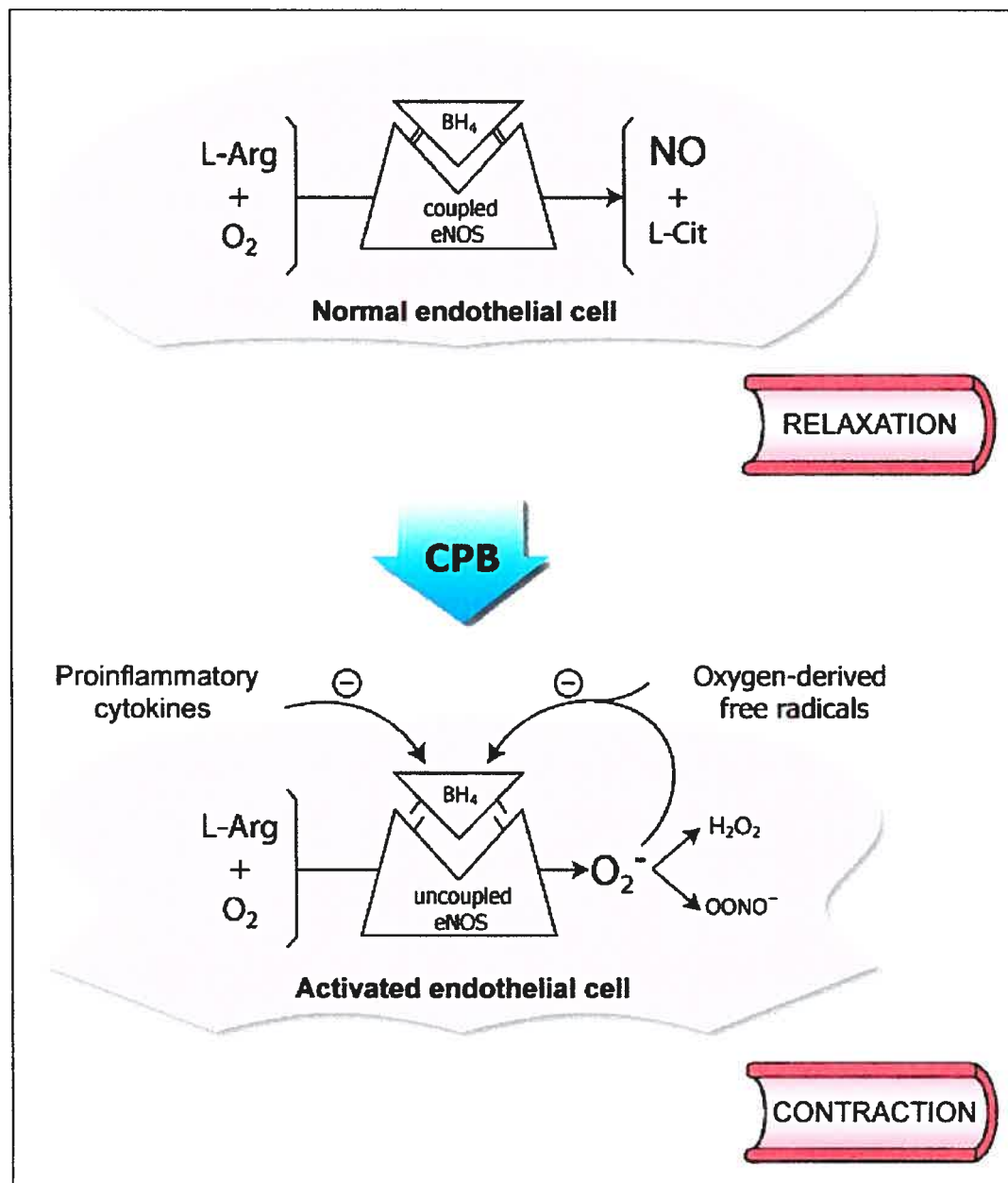
FIGURE 2.

FIGURE 3.



CHAPITRE IV

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les principales observations de cette études sont les suivantes: (a) la CEC est associée à un syndrome inflammatoire systémique caractérisé par une diminution des pressions artérielles moyennes et des résistances vasculaires systémiques indexées et une augmentation du débit cardiaque indexé et du ratio d'extraction d'oxygène; (b) les contractions dépendantes de l'endothélium à la $\text{PGF}_{2\alpha}$ des artères coronaires porcine sont diminuées après la CEC, avec ou sans traitement à la BH_4 ; (c) les relaxations dépendantes de l'endothélium à la sérotonine et la bradykinine sont significativement altérées après la CEC; (d) l'administration de BH_4 améliore partiellement les relaxations dépendantes de l'endothélium à la sérotonine et à la bradykinine.

La fonction vasomotrice de l'endothélium peut être affectée de plusieurs façons, incluant: (1) l'atteinte des protéines-G et/ou des récepteurs auxquelles elles sont couplées; (2) diminution de la relâche ou de la production de vasodilatateurs, tels que le NO, la prostacycline et/ou l'EDHF; (3) l'augmentation de la destruction ou du piégeage de NO; (4) l'augmentation de la production des vasoconstricteurs, tels que les endoperoxydes, les radicaux libres de l'oxygène et/ou de l'endothéline-1; (5) la résistance du muscle lisse vasculaire aux effets des vasodilatateurs; et (6) l'augmentation de la sensibilité du muscle lisse vasculaire aux effets des vasoconstricteurs⁴⁰. La localisation précise de l'atteinte responsable du dysfonctionnement des relaxations dépendantes de l'endothélium peut se situer à plusieurs niveaux : récepteurs, protéines-G, voies de signalisation intracellulaire (enzymes ou canaux ioniques) ou muscle vasculaire lisse. Les voies de signalisation intracellulaire suivant l'activation des protéines-G ne sont pas aisément évaluables. La caractérisation des enzymes et canaux ioniques requiert des techniques très spécialisées et n'était pas le sujet de cette étude.

Dans ce modèle porcin de CEC, les relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par les protéines-G étaient altérées, toutefois celles associée aux protéines-Gq insensibles à la toxine de la coqueluche (évaluées par la bradykinine, agoniste des récepteurs B_2) était impliqué à un moindre degré que celles associées aux protéines-

Gi sensibles à la toxine de la coqueluche (évaluées par la sérotonine, agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1D}). Les relaxations indépendantes de l'endothélium au nitroprussiate ainsi que les contractions au chlorure de potassium étaient similaires dans les trois groupes suggérant qu'il n'y avait pas d'atteinte de l'intégrité de l'endothélium dans ce modèle. L'atteinte des voies des protéines-Gi secondaire à la CEC est semblable à celles observées dans des modèles de CEC avec clampage aortique (modèle d'ischémie-reperfusion) dans le modèle canin^{225,226} et autres modèles de pathologies cardiovasculaires porcins, tels que l'endothélium régénéré, l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose chronique²²⁷, le rejet après transplantation cardiaque^{228,229} et la dysfonction endothéliale induite par les immunosupresseurs²³⁰ dans lesquels on retrouve une atteinte précoce et sélective des relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par les protéines-Gi et puis progressivement une atteinte de celles associées aux protéines-Gq. À notre connaissance, seulement deux études ont évalué succinctement la fonction endothéliale des artères coronariennes soumises à la CEC seule, sans clampage aortique ou cardioplégie^{225,226}. Ces expériences furent réalisées chez le chien et la durée exacte de CEC n'était pas spécifiée (entre 45 et 150 minutes). Aucune atteinte significative des relaxations dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine, la sérotonine, l'adénosine diphosphate (protéines-Gq), au calcium ionophore A23187 (endothélium-dépendant récepteur-indépendant) ou au sodium fluoride (un activateur direct des protéines-G) ne put être démontrée. Ces différences s'expliquent possiblement par l'importante collatéralisation des artères coronaires présente chez le modèle canin et une plus grande tolérance à l'ischémie globale et aux phénomènes d'ischémie-reperfusion systémique comparé au modèle porcine.

Effets de la tétrahydrobioptérine

La biosynthèse du NO à partir de la L-Arginine requiert plusieurs cofacteurs incluant le NADPH, le Ca²⁺/calmoduline, nucléotides flavine et la tétrahydrobioptérine (BH₄)^{181,217}. La BH₄ est un cofacteur essentiel de la

biosynthèse du NO et aide à stabiliser la forme dimérique active de la NO synthase en augmentant son affinité pour la L-Arginine et en constituant une source cinétiquement privilégiée d'électrons pour cette réaction^{175,182}. Des niveaux abaissés de BH₄ peuvent mener à un défaut de couplage de la synthase du NO, favorisant la production de peroxynitrites (OONO⁻) et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)^{165,218}, deux radicaux libres de l'oxygène ayant des effets cytotoxiques directs sur l'endothélium¹⁶⁶. Les mécanismes antioxydatifs proposés de la BH₄ sont : (1) le couplage/activation de la NO synthase et l'inhibition de la rétroaction négative du NO sur la NO synthase; (2) l'inhibition directe dose-dépendante de la production d'anion superoxyde par les oxydases hypoxanthine/xanthine¹⁷⁷; et (3) la vidange de radicaux libres par un effet réducteur direct de la BH₄¹⁹¹. La BH₄ est actif uniquement sous sa forme réduite et s'autooxyde en présence de hautes concentrations de radicaux libres, pouvant rendre la BH₄ endogène insuffisante face aux insultes oxydatives soutenues. L'administration exogène de BH₄ a permis d'améliorer la vasomotricité dépendante de l'endothélium dans de nombreux états pathologiques incluant la maladie coronarienne athérosclérotique^{198,200}, l'hypertension artérielle²⁰¹, l'hypercholestérolémie²⁰³, le diabète²⁰⁵, le tabagisme²⁰⁶, l'ischémie-reperfusion des artères coronaires^{182,208}, l'hypertrophie ventriculaire gauche²¹⁰ et la transplantation pulmonaire²⁰⁹.

Dans la présente étude, l'administration de BH₄ a permis d'améliorer partiellement les relaxations dépendantes de l'endothélium à la sérotonine et à la bradykinine qui se lient respectivement à des récepteurs couplés aux protéines-Gi et protéines-Gq. Cette correction partielle de la dysfonction endothéliale peut être expliquée par des atteintes au niveau des récepteurs, des protéines-Gi ou du muscle lisse vasculaire qui ne sont pas directement affectés par l'administration *in vitro* de BH₄. L'administration *in vivo* de BH₄ avant l'institution de la CEC pourrait possiblement prévenir la lésion oxydative avant quelle ne mène à des changements plus marqués.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, la CEC chez le porc est associée à une réponse inflammatoire systémique et une dysfonction sélective des relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par les protéines-Gi sensibles à la toxine de la coqueluche, et à un moindre degré, aux protéines-Gq insensibles à cette toxine. L'administration de BH_4 améliore les relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par les protéines-Gi et les protéines-Gq. Cette amélioration de la relaxation endothéliale coronarienne par la BH_4 pourrait s'expliquer par un meilleur du couplage de la synthase du NO, l'inhibition de la rétroaction négative du NO sur la synthase du NO et/ou une inhibition de la production ou amélioration de la vidange des radicaux libres issus de la réaction inflammatoire secondaire à la CEC (Figure 17).

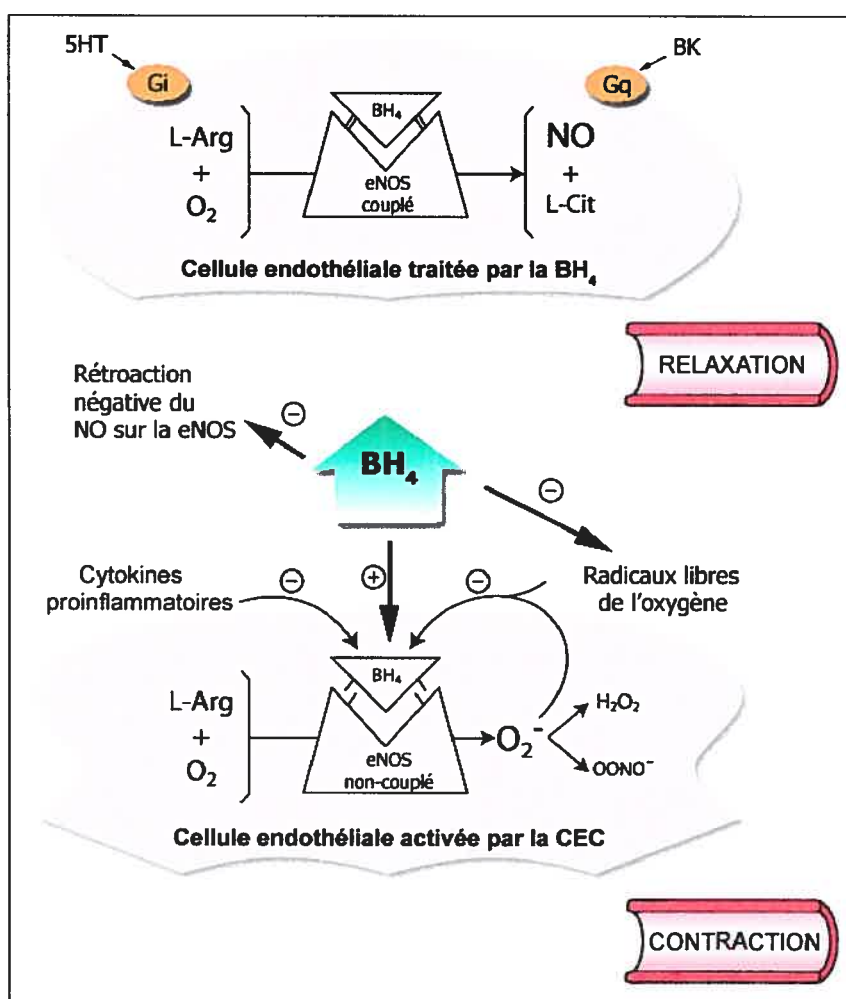


Figure 17. Mécanismes proposés de l'amélioration de la dysfonction endothéliale secondaire à la circulation extracorporelle par la tétrahydrobioptérine. 5HT : sérotonine; (+) : stimule; (-) : inhibe; BH₄ : tétrahydrobioptérine; BK : bradykinine; CEC : circulation extracorporelle; eNOS : synthase endothéliale du monoxyde d'azote; Gi/Gq : complexe de protéines Gi/Gq et leurs récepteurs membranaires respectifs impliqués dans la transduction du signal en vue de la production du monoxyde d'azote; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène; L-Arg : L-Arginine; L-Cit : L-Citrulline; NO : monoxyde d'azote; O₂ : oxygène; OONO⁻ : peroxynitrites.

L'administration *in vitro* de BH₄ dans l'amorce du circuit de CEC ou dans la solution de cardioplégie pourrait être bénéfique dans la prévention de l'insulte oxydative qui accompagne le sevrage de la CEC et la recirculation de métabolites toxiques et radicaux libres de l'oxygène. Les effets de la prostacycline²⁴⁴ et d'inhibiteurs de la phosphodiesterase (Milrinone²⁴⁵, Sildenafil²⁴⁶) ont été étudiés sur la dysfonction endothéliale des artères pulmonaires suite à la CEC dans un modèle porcin similaire. L'effet de la BH₄ suite à la CEC au niveau des lits vasculaires pulmonaires et systémiques reste à élucider.

D'autres stratégies de contrôle du syndrome de réponse inflammatoire systémique associée à la CEC ont été décrites : : les corticostéroïdes²³⁵; les anticorps monoclonaux anti-C5a²³⁶; l'inhibition de la protéine activatrice de la transcription NFκB²³⁷; les inhibiteurs de protéase tels que l'Aprotinine²³⁸ ou le Nafamostat²³⁹; les inhibiteurs des phosphodiesterase²⁴⁰; les anti-oxydants et agonistes du NO tels que l'Allopurinol²⁴¹, la L-Arginine²⁴² et la BH₄; et les bloqueurs du récepteur de l'endothéline-A²⁴³. Le contrôle de cette réponse inflammatoire systémique nécessite probablement une approche de traitement à plusieurs niveaux en tenant compte des multiples systèmes impliqués et qui peuvent tous affecter l'endothélium vasculaire.

CHAPITRE VI

SOURCES DOCUMENTAIRES

1. Boulanger C, Vanhoutte PM. The endothelium: a pivotal role in health and cardiovascular disease. Servier, 1994.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
3. Lüscher TF, Vanhoutte PM. The Endothelium : Modulator of Cardiovascular Function. CRC Press, Inc, Boca Raton 1990 : 1-228.
4. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
5. Pearson PJ and Vanhoutte PM. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1993; 122: 1-67.
6. Schini-Kerth VB and Vanhoutte PM. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Experimental Physiology* 1995; 80:885-905.
7. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *Clin Invest.* 1992 Nov;90(5):2092-6.
8. Gross SS, Jones CL, Hattori Y, Raman CS. Tetrahydrobiopterin : an essential cofactor of nitric oxide synthase with an elusive role. In: *Nitric oxide biology and pathology*. San Diego, CA: Academic Press, 2000,167-87.
9. Taylor B, Alarcon L, Billiar T. Inducible nitric oxide synthase in the liver : regulation and function. *Biochemistry Moscow* 1998; 63 : 766-81.
10. VanderVliet A, Eiserich J, Cross C. Nitric oxide : a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res.* 2000; 1 : 67-72.
11. Sanders D, Kelley T, Larson D. The role of nitric oxide synthase/ nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion* 2000; 15: 97-104.
12. Fortier S, Demaria R, Malo O, Desjardins F, Carrier M, Perrault LP. Cardiopulmonary bypass induces a selective endothelial dysfunction of epicardial porcine coronary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* In revision.

13. Kone B. Localisation and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol.* 1999; 19 : 230-241.
14. Holtz J, Forstermann U, Pohl U, Giesler M, Bassenge E. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984 Nov-Dec;6(6):1161-9.
15. Bassenge E, Heuch G. Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1990; 116:79-163.
16. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250:H1145-H1149.
17. Rubanyi GM. Endothelium-dependent pressure-induced contraction of isolated canine carotid arteries. *Am J Physiol* 1988; 255:H783-H788.
18. Rubanyi GM, Freay AD, Johns A et al. Elevated transmural pressure inhibits the release of EDRF by mechanism(s) similar to high K⁺ and barium. In: Mulvany MJ ed. *Resistance arteries, structure and function.* New-York: Elsevier. 1991;226-232.
19. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3: 2007-2018.
20. Vanhoutte PM. The endothelium - modulator of vascular smooth-muscle tone. *New Engl J Med* 1988; 319(August 25): 512-513.
21. Vanhoutte PM. The other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation* 1993; 87(suppl V): V-9-V-17.
22. Vanhoutte PM, and Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in Hypertension. *Hypertension Research -Clinical and Experimental-* 1995; 18:87-98.
23. Vanhoutte PM and Scott-Burden T. The Endothelium in Health and Disease. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1):62-67.
24. Vanhoutte PM and Shimokawa H. Endothelium-derived relaxing factor(s) and coronary vasospasm. *Circulation* 1989; 80 (No. 1): 1-9.

25. Vanhoutte PM, Gräser T and Lüscher TF. Endothelium-Derived Contracting Factors. In: Endothelin, Ed. Gabor Rubanyi, Oxford University Press, Oxford 1992; 3-16.
26. Vanhoutte PM. Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets *Eur Heart J* 1991; 12(Supp. E): 25-32.
27. Vanhoutte PM. State of the Art Lecture: Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989; 13(No.6, Part 2):658-667.
28. Vanhoutte PM, Boulanger CM, and Mombouli JV. Endothelium-Derived Relaxing Factors and Converting Enzyme Inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76:3E-12E.
29. Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Nov;28(11):2233-40.
30. Flavahan NA and Vanhoutte PM. G-Protein and Endothelial Responses. *Blood Vessels* 1990; 27:218-229.
31. Flavahan NA and Vanhoutte PM. Endothelial cell signaling and Endothelial Dysfunction. *Am J Hypertens* 1995; 8:28S-41S.
32. Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium : maestro of the blood circulation. *Phil Trans R Soc Lon B* 1994 ; 348:225-246.
33. Scott-Burden T and Vanhoutte PM. Regulation of Smooth Muscle Cell Growth by Endothelium-Derived Factors. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21(1):9.
34. Scott-Burden T and Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* 1993; 87(suppl.V):V-51-V-55.
35. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001;5:88-97.
36. Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and vascular smooth cell proliferation. *Cardiovasc Res* 1999;43:658-65.
37. Houston DS, Vanhoutte PM. Platelets and endothelium-dependent responses. In: Vanhoutte PM, Ed. *Relaxing and Contracting Factors: Biological and Clinical Research.* Humana Press, Clifton, NJ, 1988:425-449.

38. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Meth. Mol. Biol.* 1998; 100:1-32.
39. Vanhoutte PM. Dysfonctionnement endothélial et athérosclérose. *Archives des maladies du cœur et des vaisseaux* 1997; 90:9-19.
40. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction : from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 61-74.
41. Drexler H. Nitric oxide synthases in the failing human heart: a double-edge sword? *Circulation* 1999; 99:2972-5.
42. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarisation of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 93 : 3520-6.
43. Komori K, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels.* 1990;27(2-5):238-45.
44. Nagao T, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993 Jan;8(1):1-6.
45. Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest.* 1993 Dec;92(6):2867-71.
46. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996 Mar;78(3):415-23.
47. Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-Proteins and Endothelial Responses. *Blood Vessels* 1990; 27:218-229.
48. Lüscher T, Noll G. Endothelial dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:S16-S26.
49. Carville C, Raffestin B, Eddahibi S, Blouquit Y, Adnot S. Loss of endothelium-dependent relaxation in proximal pulmonary arteries from rats exposed to chronic hypoxia: effects of in vivo and in vitro supplementation with L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993 Dec;22(6):889-96.

50. Olmos L, Mombouli JV, Illiano S, Vanhoutte PM. cGMP mediates the desensitization to bradykinin in isolated canine coronary arteries. *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 2):H865-70.
51. Katzung B. The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes & related compound. In Lange A, ed. *Basic and clinical pharmacology*, Vol. 7th edition. Stanford: Prentice Hall International, 1998. pp. 305-306.
52. De Mey JG and Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall: importance of the endothelium. *Circ Res* 1982; 5:439-447.
53. Lüscher TF, Vanhoutte PM. Dysfunction of the release of endothelium-derived relaxing factor. in "Endothelial cell dysfunction" edited by Simionescu N, Simionescu M. Plenum Press New York, NY. 1992; 65-102.
54. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985; 364:45-56.
55. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann Rev Physiol* 1986 ; 48:307-320.
56. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Superoxyde anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol* 1986; 250:H822-H827.
57. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yasaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
58. Masaki T, Yanagisawa M, Goto K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 1992; 12(4):391-421.
59. Sakurai S, and Goto K. Endothelins. *Vascular Actions and Clinical Implications.* *Drugs* 1993; 46(5):795-804.
60. Schini VB and Vanhoutte PM. Endothelin-1: A potent Vasoactive Peptide. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69:1-7.
61. Vanhoutte PM. Is endothelin involved in the pathogenesis of hypertension ? *Hypertension* 1993; 21:747-751.

62. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990 Dec 20-27;348(6303):730-2.
63. Haynes WH, Ferro OJ, O'Kane KPJ. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circ* 1996; 93 : 1860-70.
64. Masaki T, Miwa S, Sawamura T, Ninomiya H, Okamoto Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jun 30;375(1-3):133-8.
65. Vanhoutte P. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81:571-577.
66. Fukuroda T, Kobayashi M, Ozaki S, Yano M, Miyauchi T, Onizuka M, Sugishita Y, Goto K, Nishikibe M. Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. *J Appl Physiol*. 1994 May;76(5):1976-82.
67. Dupuis J, Goresky C, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81:1510-1515.
68. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979; 30: 293-331.
69. Lüscher TF, Cooke JP, Houston DS, Neves RJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc*. 1987 Jul;62(7):601-6.
70. Shimizu S, Ishii M, Yamamoto T, Kawanishi T, Momose K, Kuroiwa Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1994 Jun;84(3):301-14.
71. Griendling K, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander R. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle: New concepts. *Hypertension* 1997; 29:213-239.

72. Wattanapitayakul S, Weinstein D, Holycross B, Bauer J. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *Faseb* 2000; 14:271-278.
73. Grossman W. Clinical measurement of vascular resistance and assessment of vasodilator drugs. In Grossman W, Baim D, eds. *Cardiac Catheterization, Angiography, and Intervention*. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, 1991. pp. 143-151.
74. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986 Oct 23;315(17):1046-51.
75. Lefroy DC, Crake T, Uren NG, Davies GJ, Maseri A. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation*. 1993 Jul;88(1):43-54.
76. Golino P, Piscione F, Willerson JT, Cappelli-Bigazzi M, Focaccio A, Villari B, Indolfi C, Russolillo E, Condorelli M, Chiariello M. Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med*. 1991 Mar 7;324(10):641-8.
77. Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW, Selwyn AP. Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test. *Circulation*. 1988 Jan;77(1):43-52.
78. Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1990 Aug;16(2):349-56.
79. Drexler H, Zeiher AM, Wollschlaeger H, Meinertz T, Just H, Bonzel T. Flow-dependent coronary artery dilatation in humans. *Circulation*. 1989 Sep;80(3):466-74.

80. Gordon JB, Ganz P, Nabel EG, Fish RD, Zebede J, Mudge GH, Alexander RW, Selwyn AP. Atherosclerosis influences the vasomotor response of epicardial coronary arteries to exercise. *J Clin Invest.* 1989 Jun;83(6):1946-52.
81. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation.* 1989 Sep;80(3):458-65.
82. Vita JA, Treasure CB, Ganz P, Cox DA, Fish RD, Selwyn AP. Control of shear stress in the epicardial coronary arteries of humans: impairment by atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1989 Nov 1;14(5):1193-9.
83. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1990 Feb;81(2):491-7.
84. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlaeger H, Saurbier B, Just H. Coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: importance of the functional integrity of the endothelium. *J Am Coll Cardiol.* 1989 Nov 1;14(5):1181-90.
85. Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, Vita JA, Ryan TJ Jr, Ganz P, Selwyn AP. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med.* 1991 Nov 28;325(22):1551-6.
86. McLenachan JM, Williams JK, Fish RD, Ganz P, Selwyn AP. Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis. *Circulation.* 1991 Sep;84(3):1273-8.
87. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1994 Mar 15;23(4):833-43.
88. Shibano T, Codina J, Birnbaumer L, Vanhoutte PM. Pertussis toxin-sensitive G proteins in regenerated endothelial cells of porcine coronary artery. *Am J Physiol.* 1994 Sep;267(3 Pt 2):H979-81.

89. Shimokawa H, Vanhoutte PM. Angiographic demonstration of hyperconstriction induced by serotonin and aggregating platelets in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 1197-202.
90. Mora C, Guyton R, Rigatti R, Finlayson D. Cardiopulmonary bypass: principles and techniques of extracorporeal circulation. New York: Springer-Verlag, 1995.
91. Riess FC, Lower C, Seelig C, Bleese N, Kormann J, Muller-Berghaus G, Potzsch B. Recombinant hirudin as a new anticoagulant during cardiac operations instead of heparin: successful for aortic valve replacement in man. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Jul;110(1):265-7.
92. Wilhelm MJ, Schmid C, Kececioglu D, Mollhoff T, Ostermann H, Scheld HH. Cardiopulmonary bypass in patients with heparin-induced thrombocytopenia using Org 10172. *Ann Thorac Surg.* 1996 Mar;61(3):920-4.
93. Gillis S, Merin G, Zahger D, Deeb M, Drenger B, Hyam E, Eldor A. Danaparoid for cardiopulmonary bypass in patients with previous heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 1997 Sep;98(3):657-9.
94. Bernabei A, Gikakis N, Maione TE, Kowalska MA, Yan Z, Niewiarowski S, Edmunds LH Jr. Reversal of heparin anticoagulation by recombinant platelet factor 4 and protamine sulfate in baboons during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Apr;109(4):765-71.
95. Ellison N, Edmunds LH Jr, Colman RW. Platelet aggregation following heparin and protamine administration. *Anesthesiology.* 1978 Jan;48(1):65-8.
96. Khuri SF, Valeri CR, Loscalzo J, Weinstein MJ, Birjiniuk V, Healey NA, MacGregor H, Doursounian M, Zolkewitz MA. Heparin causes platelet dysfunction and induces fibrinolysis before cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1995 Oct;60(4):1008-14.
97. Sobel M, McNeill PM, Carlson PL, Kermode JC, Adelman B, Conroy R, Marques D. Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1991 May;87(5):1787-93.

98. Pixley RA, Cassello A, De La Cadena RA, Kaufman N, Colman RW. Effect of heparin on the activation of factor XII and the contact system in plasma. *Thromb Haemost.* 1991 Nov 1;66(5):540-7.
99. Wachtfogel YT, Harpel PC, Edmunds LH Jr, Colman RW. Formation of C1s-C1-inhibitor, kallikrein-C1-inhibitor, and plasmin-alpha 2-plasmin-inhibitor complexes during cardiopulmonary bypass. *Blood.* 1989 Feb;73(2):468-71.
100. Cavarocchi NC, Schaff HV, Orszulak TA, Homburger HA, Schnell WA Jr, Pluth JR. Evidence for complement activation by protamine-heparin interaction after cardiopulmonary bypass. *Surgery.* 1985 Sep;98(3):525-31.
101. Kirklin JK, Chenoweth DE, Naftel DC, Blackstone EH, Kirklin JW, Bitran DD, Curd JG, Reves JG, Samuelson PN. Effects of protamine administration after cardiopulmonary bypass on complement, blood elements, and the hemodynamic state. *Ann Thorac Surg.* 1986 Feb;41(2):193-9.
102. Brash JL, Scott CF, ten Hove P, Wojciechowski P, Colman RW. Mechanism of transient adsorption of fibrinogen from plasma to solid surfaces: role of the contact and fibrinolytic systems. *Blood.* 1988 Apr;71(4):932-9.
103. Lindon JN, McManama G, Kushner L, Merrill EW, Salzman EW. Does the conformation of adsorbed fibrinogen dictate platelet interactions with artificial surfaces? *Blood.* 1986 Aug;68(2):355-62.
104. Blackstone EH, Kirklin JW, Stewart RW, et al. The damaging effects of cardiopulmonary bypass. In: Wu KK, Roxy EC, eds. *Prostaglandins in clinical medicine: cardiovascular and thrombotic disorders.* Chicago: Year Book, 1982: 355.
105. Frering B, Philip I, Dehoux M, Rolland C, Langlois JM, Desmonts JM. Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Oct;108(4):636-41.
106. Wan S, DeSmet JM, Barvais L, Goldstein M, Vincent JL, LeClerc JL. Myocardium is a major source of proinflammatory cytokines in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Sep;112(3):806-11.

107. Stahl RF, Fisher CA, Kucich U, Weinbaum G, Warsaw DS, Stenach N, O'Connor C, Addonizio VP. Effects of simulated extracorporeal circulation on human leukocyte elastase release, superoxide generation, and procoagulant activity. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991 Feb;101(2):230-9.
108. Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med.* 1981 Feb 26;304(9):497-503.
109. Boyle EM Jr, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg.* 1997 Jan;63(1):277-84.
110. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardio Thor Surg* 2002; 21: 232-244.
111. Asimakopoulos G. Systemic inflammation and cardiac surgery: An update. *Perfusion* 2001; 16: 353-60.
112. Edmunds LH. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: S12-6.
113. Bruins P, te Velhuis H, Yazdanbakhsh AP, Jansen PG, van Hardevelt FW, de Beaumont EM, Wildevuur CR, Eijssman L, Trouwborst A, Hack CE. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation.* 1997 Nov 18;96(10):3542-8.
114. Verrier ED, Morgan EN. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: S17-19.
115. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983 Dec;86(6):845-57.

116. van Velzen-Blad H, Dijkstra YJ, Heijnen CJ, Schurink GA, Zegers BJ, Ballieux RE. Cardiopulmonary bypass and host defense functions in human beings: II. Lymphocyte function. *Ann Thorac Surg.* 1985 Mar;39(3):212-7.
117. Utley JR. Pathophysiology of cardiopulmonary bypass: current issues. *J Card Surg.* 1990 Sep;5(3):177-89.
118. Banner DW. The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):512-5.
119. Chung JH, Gikakis N, Rao AK, Drake TA, Colman RW, Edmunds LH Jr. Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1996 Jun 1;93(11):2014-8.
120. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989 May;134(5):1087-97.
121. Levin EG, Marzec U, Anderson J, Harker LA. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1984 Dec;74(6):1988-95.
122. Muller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol.* 1986;4:503-28.
123. Gerard C, Gerard NP. C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:775-808.
124. Coughlin SR, Vu TK, Hung DT, Wheaton VI. Characterization of a functional thrombin receptor. Issues and opportunities. *J Clin Invest.* 1992 Feb;89(2):351-5.
125. Wiedmer T, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. *Blood.* 1986 Oct;68(4):875-80.
126. Niewiarowski S, Senyi AF, Gillies P. Plasmin-induced platelet aggregation and platelet release reaction. Effects on hemostasis. *J Clin Invest.* 1973 Jul;52(7):1647-59.

127. Cramer EM, Lu H, Caen JP, Soria C, Berndt MC, Tenza D. Differential redistribution of platelet glycoproteins Ib and IIb-IIIa after plasmin stimulation. *Blood*. 1991 Feb 15;77(4):694-9. Erratum in: *Blood* 1991 Jul 15;78(2):545.
128. Lu H, Soria C, Cramer EM, Soria J, Macclouf J, Perrot JY, Li H, Commin PL, Schumann F, Regnier O, et al. Temperature dependence of plasmin-induced activation or inhibition of human platelets. *Blood*. 1991 Mar 1;77(5):996-1005.
129. Michelson AD, MacGregor H, Barnard MR, Kestin AS, Rohrer MJ, Valeri CR. Reversible inhibition of human platelet activation by hypothermia in vivo and in vitro. *Thromb Haemost*. 1994 May;71(5):633-40.
130. Weerasinghe A, Taylor KM. The platelet in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1998 Dec;66(6):2145-52.
131. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*. 1990 Jan 1;75(1):128-38.
132. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med*. 1995 Jun 8;332(23):1553-9.
133. Rinder CS, Bohnert J, Rinder HM, Mitchell J, Ault K, Hillman R. Platelet activation and aggregation during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*. 1991 Sep;75(3):388-93.
134. Gluszko P, Rucinski B, Musial J, Wenger RK, Schmaier AH, Colman RW, Edmunds LH Jr, Niewiarowski S. Fibrinogen receptors in platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuit. *Am J Physiol*. 1987 Mar;252(3 Pt 2):H615-21.
135. Sheppeck RA, Bentz M, Dickson C, Hribar S, White J, Janosky J, Berceli SA, Borovetz HS, Johnson PC. Examination of the roles of glycoprotein Ib and glycoprotein IIb/IIIa in platelet deposition on an artificial surface using clinical antiplatelet agents and monoclonal antibody blockade. *Blood*. 1991 Aug 1;78(3):673-80.

136. Musial J, Niewiarowski S, Hershock D, Morinelli TA, Colman RW, Edmunds LH Jr. Loss of fibrinogen receptors from the platelet surface during simulated extracorporeal circulation. *J Lab Clin Med.* 1985 Apr;105(4):514-22.
137. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood.* 1991 Oct 1;78(7):1760-9.
138. Addonizio VP Jr, Smith JB, Strauss JF 3rd, Colman RW, Edmunds LH Jr. Thromboxane synthesis and platelet secretion during cardiopulmonary bypass with bubble oxygenator. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1980 Jan;79(1):91-6.
139. Hennessy VL Jr, Hicks RE, Niewiarowski S, Edmunds LH Jr, Colman RW. Function of human platelets during extracorporeal circulation. *Am J Physiol.* 1977 Jun;232(6):H622-8.
140. Addonizio VP Jr, Strauss JF 3rd, Chang LF, Fisher CA, Colman RW, Edmunds LH Jr. Release of lysosomal hydrolases during simulated extracorporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982 Jul;84(1):28-34.
141. Cave AC, Manche A, Derias NW, Hearse DJ. Thromboxane A2 mediates pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in the rabbit. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Dec;106(6):959-67.
142. Byrne JG, Appleyard RF, Sun SC, Couper GS, Sloane JA, Laurence RG, Cohn LH. Cardiac-derived thromboxane A2. An initiating mediator of reperfusion injury? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Apr;105(4):689-93.
143. Asimakopoulos G, Taylor KM. Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *Ann Thorac Surg.* 1998 Dec;66(6):2135-44.
144. Kappelmayer J, Bernabei A, Gikakis N, Edmunds LH Jr, Colman RW. Upregulation of Mac-1 surface expression on neutrophils during simulated extracorporeal circulation. *J Lab Clin Med.* 1993 Jan;121(1):118-26.
145. Hashimoto K, Miyamoto H, Suzuki K, Horikoshi S, Matsui M, Arai T, Kurosawa H. Evidence of organ damage after cardiopulmonary bypass. *The*

- role of elastase and vasoactive mediators. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Sep;104(3):666-73.
146. Zhu ZG, Wang MS, Jiang ZB, Jiang Z, Xu SX, Ren CY, Shi MX. The dynamic change of plasma endothelin-1 during the perioperative period in patients with rheumatic valvular disease and secondary pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Nov;108(5):960-8.
 147. Matheis G, Haak T, Beyersdorf F, Baretti R, Polywka C, Winkelmann BR. Circulating endothelin in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1995;9(5):269-74.
 148. Martin R. Alterations in leukocyte structure and function due to mechanical trauma. In: Hwang N, Gross D, Patel D, eds. *Quantitative cardiovascular studies: clinical and research applications of engineering principles.* Baltimore: University Park Press, 1979:419.
 149. Colman RW. Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J Clin Invest.* 1984 May;73(5):1249-53.
 150. Chenoweth DE, Hugli TE. Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Aug;75(8):3943-7.
 151. Wachtfogel YT, Kucich U, Greenplate J, Gluszko P, Abrams W, Weinbaum G, Wenger RK, Rucinski B, Niewiarowski S, Edmunds LH Jr, et al. Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation. *Blood.* 1987 Jan;69(1):324-30.
 152. Kappelmayer J, Bernabei A, Edmunds LH Jr, Edgington TS, Colman RW. Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ Res.* 1993 May;72(5):1075-81.
 153. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Labeta M, Schmidt B, Samtleben W, Ziegler-Heitbrock HW, Blumenstein M. Down-regulation of surface monocyte lipopolysaccharide-receptor CD14 in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aorta-coronary bypass operation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 May;115(5):1172-8.

154. Markewitz A, Faist E, Lang S, Endres S, Fuchs D, Reichart B. Successful restoration of cell-mediated immune response after cardiopulmonary bypass by immunomodulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Jan;105(1):15-24.
155. Haeffner-Cavaillon N, Roussellier N, Ponzio O, Carreno MP, Laude M, Carpentier A, Kazatchkine MD. Induction of interleukin-1 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989 Dec;98(6):1100-6.
156. Ernofsson M, Siegbahn A. Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemotactic protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. *Thromb Res.* 1996 Aug 15;83(4):307-20.
157. Ernofsson M, Thelin S, Siegbahn A. Monocyte tissue factor expression, cell activation, and thrombin formation during cardiopulmonary bypass: a clinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997 Mar;113(3):576-84.
158. Roth JA, Golub SH, Cukingnan RA, Brazier J, Morton DL. Cell-mediated immunity is depressed following cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1981 Apr;31(4):350-6.
159. Hisatomi K, Kobayashi A, Moriyama Y, Shimokawa S, Toyohira H, Taira A. Combined suppressive effect of cardiopulmonary bypass and aging on cell-mediated immunity. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997 Jul;114(1):140-1.
160. Nguyen DM, Mulder DS, Shennib H. Effect of cardiopulmonary bypass on circulating lymphocyte function. *Ann Thorac Surg.* 1992 Apr;53(4):611-6.
161. DePalma L, Yu M, McIntosh CL, Swain JA, Davey RJ. Changes in lymphocyte subpopulations as a result of cardiopulmonary bypass. The effect of blood transfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991 Feb;101(2):240-4.
162. Hisatomi K, Isomura T, Kawara T, Yamashita M, Hirano A, Yoshida H, Eriguchi N, Kosuga K, Ohishi K. Changes in lymphocyte subsets, mitogen responsiveness, and interleukin-2 production after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989 Oct;98(4):580-91.

163. Hirayama T, Yamaguchi H, Allers M, Roberts D. Evaluation of red cell damage during cardiopulmonary bypass. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;19(3):263-5.
164. Hoffman JF. Cation transport and structure of the red-cell plasma membrane. *Circulation.* 1962 Nov;26:1202-13.
165. Cosentino F, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 1999;43:274-8.
166. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 1994;23:229-35.
167. Prasad K, Kalra J, Bharadwaj B, Chaudhary AK. Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery. *Am Heart J.* 1992 Jan;123(1):37-45.
168. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986 Apr 3-9;320(6061):454-6.
169. Verrier ED, Shen I. Potential role of neutrophil anti-adhesion therapy in myocardial stunning, myocardial infarction, and organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. *J Card Surg.* 1993 Mar;8(2 Suppl):309-12.
170. MacCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ, Shah AM. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation.* 2001 Dec 11;104(24):2967-74.
171. Jansen NJ, van Oeveren W, Gu YJ, van Vliet MH, Eijssman L, Wildevuur CR. Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1992 Oct;54(4):744-7.
172. Taggart DP, Sundaram S, McCartney C, Bowman A, McIntyre H, Courtney JM, Wheatley DJ. Endotoxemia, complement, and white blood cell activation in cardiac surgery: a randomized trial of laxatives and pulsatile perfusion. *Ann Thorac Surg.* 1994 Feb;57(2):376-82.

173. Bvaue AE. The role of the gut in the development of multiple organ dysfunction in cardiothoracic patients. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 822-39.
174. Campbell KL, Forse RA. Endotoxin-exposed atria exhibit G protein-based deficits in inotropic regulation. *Surgery*. 1993 Aug;114(2):471-8.
175. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep;281(3):H981-6.
176. Kaufman S. A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J Biol Chem*. 1958 Feb;230(2):931-9.
177. Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxyde and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Aug 18;237(2):340-4.
178. Tsutsui M, Milstien S, Katusic ZS. Effect of tetrahydrobiopterin on endothelial function in canine middle cerebral arteries. *Circ Res*. 1996;79:336-342.
179. Nichols CA, Smith GK, Duch DS. Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:728-764.
180. Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis : an absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 1992;267:25722-25729.
181. Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*. 1995;91:139-144.
182. Scott-Burden T. Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 1995;91:248-250.
183. Kinoshita H, Milstien S, Wambi C, Katusic ZS. Inhibition of tetrahydrobiopterin biosynthesis impairs endothelium-dependent relaxations in canine basilar artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1997;273:H718-H724.
184. Tiefenbacher CP, Chillian WM, Mitchell M, DeFily DV. Restoration of endothelium-dependent vasodilatation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 1996;94:1423-1429.

185. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxyde synthases. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):14533-6.
186. Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jun;280(6):H2484-8.
187. Masters BS. Structural variations to accommodate functional themes of the isoforms of NO synthases. In: *Nitric Oxyde. Biology and Pathobiology*. San Diego, CA: Academic, 2000, p. 91-105.
188. Mayer B, Werner ER. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxyde. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995 May;351(5):453-63.
189. Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. Ca^{2+} /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxyde by brain nitric oxyde synthase. *Biochem J*. 1992 Feb 1;281 (Pt 3):627-30.
190. Vasquez-Vivar J, Whitsett J, Martasek P, Hogg N, Kalyanaraman B. Reaction of tetrahydrobiopterin with superoxyde: EPR-kinetic analysis and characterization of the pteridine radical. *Free Radic Biol Med*. 2001 Oct 15;31(8):975-85.
191. Patel KB, Stratford MR, Wardman P, Everett SA. Oxydation of tetrahydrobiopterin by biological radicals and scavenging of the trihydrobiopterin radical by ascorbate. *Free Radic Biol Med*. 2002 Feb 1;32(3):203-11.
192. Milstien S, Katusic Z. Oxydation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Oct 5;263(3):681-4.
193. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1282-8.

194. Tatzber F, Rabl H, Koriska K, Erhart U, Puhl H, Waeg G, Krebs A, Esterbauer H. Elevated serum neopterin levels in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1991 Aug;89(2-3):203-8.
195. Schoedon G, Schneemann M, Blau N, Edgell CJ, Schaffner A. Modulation of human endothelial cell tetrahydrobiopterin synthesis by activating and deactivating cytokines: new perspectives on endothelium-derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Nov 15;196(3):1343-8.
196. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, Pober JS. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2236-43.
197. Kirsch M, Korth HG, Stenert V, Sustmann R, de Groot H. The autoxydation of tetrahydrobiopterin revisited. Proof of superoxide formation from reaction of tetrahydrobiopterin with molecular oxygen. *J Biol Chem*. 2003 Jul 4;278(27):24481-90.
198. Maier W, Cosentino F, Lutolf RB, Fleisch M, Seiler C, Hess OM, Meier B, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000 Feb;35(2):173-8.
199. Tiefenbacher CP, Blecke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kubler W. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation*. 2000 Oct 31;102(18):2172-9.
200. Setoguchi S, Mohri M, Shimokawa H, Takeshita A. Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in coronary microcirculation in patients without epicardial coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Aug;38(2):493-8.
201. Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest*. 1998 Apr 1;101(7):1530-7.

202. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Lüscher T, Rabelink T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1997 Jan 1;99(1):41-6.
203. Fukuda Y, Teragawa H, Matsuda K, Yamagata T, Matsuura H, Chayama K. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia. *Heart.* 2002 Mar;87(3):264-9.
204. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, Masada M, Toda N, Kikkawa R, Kashiwagi A. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res.* 2000 Sep 29;87(7):566-73.
205. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000 Nov;43(11):1435-8.
206. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2000 Feb 4;86(2):E36-41.
207. Yamashiro S, Noguchi K, Matsuzaki T, Miyagi K, Nakasone J, Sakanashi M, Kojima K, Sakanashi M. Beneficial effect of tetrahydrobiopterin on ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Oct;124(4):775-84.
208. Verma S, Maitland A, Weisel RD, Fedak PW, Pomroy NC, Li SH, Mickle DA, Li RK, Rao V. Novel cardioprotective effects of tetrahydrobiopterin after anoxia and reoxygenation: Identifying cellular targets for pharmacologic manipulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Jun;123(6):1074-83.
209. Schmid RA, Hillinger S, Walter R, Zollinger A, Stammberger U, Speich R, Schaffner A, Weder W, Schoedon G. The nitric oxide synthase cofactor

- tetrahydrobiopterin reduces allograft ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Oct;118(4):726-32.
210. Malo O, Desjardins F, Tanguay JF, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP. Tetrahydrobiopterin and antioxydants reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model. *Cardiovasc Res.* 2003 Aug 1;59(2):501-11.
 211. El-Hamamsy I, Grant M, Stevens LM, Malo O, Carrier M, Perrault LP. Cyclosporin-Induced Coronary Endothelial Dysfunction: Is Tetrahydrobiopterin the Solution? (Soumis au: *Journal of Heart and Lung Transplantation*).
 212. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Nagata D, Tojo A, Nishimatsu H, Nakanishi N, Hattori Y, Kikuchi K, Nagano T, Omata M. Effects of tetrahydrobiopterin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Feb;11(2):301-9.
 213. Jiang J, Valen G, Tokuno S, Thoren P, Pernow J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. *Br J Pharmacol.* 2000 Dec;131(7):1255-61.
 214. Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* 2001 Jan 5;276(1):40-7.
 215. Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF Jr. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17399-406.
 216. Lamarche Y, Gagnon J, Malo O, Blaise G, Carrier M, Perrault LP. Ventilation prevents pulmonary endothelial dysfunction and improves oxygenation after cardiopulmonary bypass without aortic cross-clamping. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Sep;26(3):554-63.

217. Moncana S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-142.
218. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1986;250(Heart Circ Physiol 19):H815-H821.
219. Bruins P, te Velthuis H, Eerenberg-Belmer AJ, Yazdanbakhsh AP, de Beaumont EM, Eijssman L, Trouwborst A, Hack CE. Heparin-protamine complexes and C-reactive protein induce activation of the classical complement pathway: studies in patients undergoing cardiac surgery and in vitro. *Thromb Haemost.* 2000 Aug;84(2):237-43.
220. Li JM, Hajarizadeh H, La Rosa CA, Rohrer MJ, Vander Salm TJ, Cutler BS. Heparin and protamine stimulate the production of nitric oxide. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1996 Oct;37(5):445-52.
221. Brody, S. *Bioenergetics and Growth.* New York: Reinhold, 1945.
222. Najibi S, Cowan CL, Palacino JJ, Cohen RA. Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid arteries. *Am J Physiol.* 1994;226:H2061-7.
223. Cugno M, Nussberger J, Biglioli P, Alamanni F, Coppola R, Agostoni A. Increase of bradykinin in plasma of patients undergoing cardiopulmonary bypass; The importance of lung exclusion. *Chest.* 2001;120:1776-1782.
224. Shimizu S, Ishii M, Yamamoto T, Kawanishi T, Momose K, Kuroiwa Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1994;84:301-314.
225. Evora PR, Pearson PJ, Schaff HV. Impaired endothelium-dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. *Ann Thorac Surg.* 1994;57:1550-6.
226. Pearson PJ, Lin PJ, Schaff HV. Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery. A possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;103:1147-54.

227. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation*. 1991 Feb;83(2):652-60.
228. Perrault LP, Mahlberg F, Breugnot C, Bidouard JP, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Hypercholesterolemia increases coronary endothelial dysfunction, lipid content, and accelerated atherosclerosis after heart transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Mar;20(3):728-36.
229. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM. Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine coronary endothelium during rejection after heart transplantation. *J Cardiovasc Research*. 1999;43:457-470.
230. Jeanmart H, Malo O, Carrier M, Nickner C, Desjardins N, Perrault LP. Comparative study of cyclosporine and tacrolimus vs newer immunosuppressants mycophenolate mofetil and rapamycin on coronary endothelial function. *J Heart Lung Transplant*. 2002 Sep;21(9):990-8.
231. Nakanishi K, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J, Lewis JC, McGee DS, Hammon JW Jr. Coronary artery endothelial dysfunction after global ischemia, blood cardioplegia, and reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 1994;58:191-9.
232. Dignan RJ, Dyke CM, Abd-Elfattah AS, Lutz HA, Yeh T Jr, Lee KF, et al. Coronary artery endothelial cell and smooth muscle dysfunction after global myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg*. 1992;53:311-7.
233. Boyle EM Jr, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:1868-75.
234. Sayin MM, Ozatamer O, Tasoz R, Kilinc K, Unal N. Propofol attenuates myocardial lipid peroxydation during coronary artery bypass grafting surgery. *Br J Anaesth*. 2002 Aug;89(2):242-6.
235. Jansen NJ, van Oeveren W, van Vliet M, Stoutenbeek CP, Eysman L, Wildevuur CR. The role of different types of corticosteroids on the

- inflammatory mediators in cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1991;5(4):211-7.
236. Tofukuji M, Stahl GL, Agah A, Metais C, Simons M, Sellke FW. Anti-C5a monoclonal antibody reduces cardiopulmonary bypass and cardioplegia-induced coronary endothelial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Dec;116(6):1060-8.
 237. Kovacich JC, Boyle EM Jr, Morgan EN, Canty TG Jr, Farr AL, Caps MT, Frank N, Pohlman TH, Verrier ED. Inhibition of the transcriptional activator protein nuclear factor κ B prevents hemodynamic instability associated with the whole-body inflammatory response syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Jul;118(1):154-62.
 238. Wachtfogel YT, Kucich U, Hack CE, Glusko P, Niewiarowski S, Colman RW, Edmunds LH Jr. Aprotinin inhibits the contact, neutrophil, and platelet activation systems during simulated extracorporeal perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Jul;106(1):1-9.
 239. Sundaram S, Gikakis N, Hack CE, Niewiarowski S, Edmunds LH Jr, Koneti Rao A, Sun L, Cooper SL, Colman RW. Nafamostat mesilate, a broad spectrum protease inhibitor, modulates platelet, neutrophil and contact activation in simulated extracorporeal circulation. *Thromb Haemost.* 1996 Jan;75(1):76-82.
 240. Mollhoff T, Loick HM, Van Aken H, Schmidt C, Rolf N, Tjan TD, Asfour B, Berendes E. Milrinone modulates endotoxemia, systemic inflammation, and subsequent acute phase response after cardiopulmonary bypass (CPB). *Anesthesiology.* 1999 Jan;90(1):72-80.
 241. Coghlan JG, Flitter WD, Clutton SM, Panda R, Daly R, Wright G, Ilsley CD, Slater TF. Allopurinol pretreatment improves postoperative recovery and reduces lipid peroxydation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Jan;107(1):248-56.
 242. Morita K, Sherman MP, Buckberg GD, Ihnken K, Matheis G, Young HH, Ignarro LJ. Studies of hypoxemic/reoxygenation injury: without aortic

- clamping. V. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway: the nitric oxide paradox. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Oct;110(4 Pt 2):1200-11.
243. Joffs C, Walker CA, Hendrick JW, Fary DJ, Almany DK, Davis JN, Goldberg AT, Crawford FA Jr, Spinale FG. Endothelin receptor subtype A blockade selectively reduces pulmonary pressure after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Aug;122(2):365-70.
- 244 Fortier S, DeMaria RG, Lamarche Y, Malo O, Denault A, Desjardins F, Carrier M, Perrault LP. Inhaled prostacyclin reduces cardiopulmonary bypass-induced pulmonary endothelial dysfunction via increased cyclic adenosine monophosphate levels. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 Jul;128(1):109-16.
- 245 Lamarche Y, Malo O, Thorin E, Denault A, Carrier M, Roy J, Perrault LP. Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction following CPB. *J Thorac Cardiovasc Surg* (sous presse).
- 246 Lamarche Y, Denault A, Carrier M, Roy J, Perrault LP. Intravenous sildenafil prevents the pulmonary endothelial dysfunction due to cardiopulmonary bypass. *Circulation* (soumis).